

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



EP04/11512

REC'D 06 DEC 2004
WIPO

12 NOV 2004

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 103 47 710.1

**Anmeldetag:** 14. Oktober 2003

**Anmelder/Inhaber:** Johannes Gutenberg-Universität Mainz,  
55122 Mainz/DE

**Bezeichnung:** Rekombinante Impfstoffe und deren Verwendung

**IPC:** C 07 K, A 61 K, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 28. Oktober 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

*[Signature]*  
Schäfer

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

14. Okt. 2003

Neue deutsche Patentanmeldung

JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ, VERTRETEN DURCH DEN PRÄSIDENTEN  
U.Z.: 410-1

5

### **Rekombinante Impfstoffe und deren Verwendung**

Die vorliegende Erfindung betrifft Fusionsmoleküle von Antigenen, die dafür kodierenden Nukleinsäuren und die Verwendung derartiger Fusionsmoleküle und Nukleinsäuren. Insbesondere betrifft die Erfindung Fusionsmoleküle, die ein Antigen und die Transmembranregion und cytoplasmatische Region eines MHC-Moleküls bzw. die cytoplasmatische Region eines MHC oder eines SNARE-Moleküls umfassen.

15 Erfindungsgemäße Fusionsmoleküle sind für eine Vielzahl von Anwendungen verwendbar, einschließlich in Verfahren zur Induktion einer Immunreaktion in einem Säuger.

Antigen-spezifische T-Zell-Reaktionen werden durch antigene Peptide, die an die Bindungsgrube von Glykoproteinen des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes (MHC) gebunden sind, als Teil des Mechanismus des Immunsystems hervorgerufen, bei dem fremde Antigene identifiziert und eine Reaktion gegen sie ausgelöst wird. Die gebundenen antigenen Peptide interagieren mit T-Zell-Rezeptoren und modulieren so eine Immunreaktion. Die antigenen Peptide sind nicht-kovalent an bestimmte „Bindetaschen“ gebunden, die von polymorphen Resten der Bindungsgrube des MHC-Proteins gebildet werden.

MHC Klasse II-Moleküle sind heterodimere Glykoproteine, die aus  $\alpha$ - und  $\beta$ - Ketten bestehen. Die  $\alpha$ 1- und  $\beta$ 1-Domänen dieser Moleküle falten sich zusammen und bilden eine Peptid-Bindungsgrube. Antigene Peptide binden an das MHC-Molekül durch Interaktion zwischen Anker-Aminosäuren auf dem Peptid und den  $\alpha$ 1- und  $\beta$ 1-Domänen. Die Kristallstruktur des

menschlichen Klasse II-HLA-DR1-Komplexes mit einem Influenzavirus-Peptid zeigt, dass sich die N- und C-terminalen Enden des gebundenen Peptids aus der Bindungsgrube erstrecken, so dass der C-Terminus des Peptids nahe zum N-Terminus der  $\beta$ -Kette liegt [Brown, J.H. et al., 1993, Nature 364:33-39; Stern, L.J. et al., 1994, Nature 368:215-221]. MHC Klasse I-Moleküle besitzen andere Domänen-Organisationen als MHC Klasse II-Moleküle, jedoch im Allgemeinen eine ähnliche Struktur mit einer Peptid-Bindestelle oder -grube, die zu den Membrandomänen entfernt liegt [vgl. z.B. Rudensky, A.Y. et al., 1991, Nature 353:622-627].

10

Der anfängliche Schritt bei der Präsentation eines fremden Protein-Antigens ist die Bindung des nativen Antigens an eine Antigen-präsentierende Zelle (APC). Nach Bindung an APCs dringen Antigene in die Zellen ein, entweder durch Phagozytose, Rezeptor-vermittelte Endozytose oder Pinozytose.

15 Derartige internalisierte Antigene sind in intrazellulären Membran-gebundenen Vesikeln, die Endosome genannt werden, lokalisiert. Nach einer Endosomen-Lysosomen-Fusion werden die Antigene in kleine Peptide durch in den Lysosomen gelegene zelluläre Proteasen prozessiert. Die Peptide assoziieren mit den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten von MHC Klasse II-Molekülen innerhalb  
20 dieser Lysosomen. Diese MHC Klasse II-Moleküle, die zuvor im rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert worden waren, werden sequentiell an die Golgi-Komplexe und sodann an das lysosomale Kompartiment transportiert. Der Peptid-MHC-Komplex wird auf der Oberfläche von APCs für eine T- und B-Zell-Aktivierung präsentiert. Daher sind die  
25 Zugängigkeit von proteolytischen Prozessierungsstellen in dem Antigen, die Stabilität der resultierenden Peptide in den Lysosomen und die Affinitäten der Peptide für MHC-Moleküle bestimmende Faktoren für die Immunogenität eines spezifischen Epitops.

30 Rekombinante Impfstoffe haben in der Human- und Veterinärmedizin eine besondere Bedeutung als Wirkstoffe und Arzneimittel für die Prophylaxe und Therapie von Infektions- und Krebserkrankungen. Ziel einer Impfung mit

einem rekombinanten Impfstoff ist, gegen ein definiertes Antigen eine spezifische Immunreaktion zu induzieren, die präventiv oder therapeutisch gegen definierte Krankheiten wirksam ist.

- 5 Ein für die Effektivität eines rekombinanten Impfstoffs wesentlicher Faktor ist die optimale Stimulation von T-Lymphozyten des immunisierten Organismus. So belegt eine Reihe von tierexperimentellen Untersuchungen, dass für eine effektive Immuntherapie von Tumoren sowohl die optimale Stimulation von CD8<sup>+</sup>- als auch CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten notwendig ist. Die
- 10 bekannten Hauptformen von rekombinanten Vakzinen basieren auf rekombinanten Proteinen, synthetischen Peptidfragmenten, rekombinanten Viren und Nukleinsäureimpfstoffen auf DNA bzw. RNA-Basis. In den letzten Jahren bekamen Impfstoffe auf DNA und RNA-Nukleinsäurebasis eine zunehmende Bedeutung. Für sehr viele Ziele, unter anderem
- 15 Tumorantigene, lässt sich jedoch mit rekombinanten Impfstoffen auf Nukleinsäurebasis eine nur sehr schlechte bis gar keine Stimulation von CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten erreichen. Daher wurde eine Reihe gentechnischer Modifikationen entwickelt, mit der Absicht, die Immunogenität von rekombinanten Impfstoffen zu erhöhen. Hierbei sind bisher verschiedene
- 20 Verfahren getestet worden, u.a. Verfremdung von Immunogenen durch Veränderung der Primärsequenz oder durch Fusion an Fremdepitope z.B. von Bakterien oder Viren [Lowenadler, B. et al., 1990, Eur. J. Immunol. 20: 1541-45; Clarke, B. E. et al., 1987, Nature 330: 381-84] und Herstellung von chimären Produkten, bestehend aus dem eigentlichen Antigen und
- 25 immunmodulatorischen Proteinen wie z.B. Zytokinen [Ruckert, R. et al., 1998, Eur. J. Immunol. 28: 3312-20; Harvill, E. T., J. M. Fleming, und S. L. Morrison, 1996, J. Immunol. 157: 3165-70]. Impfstoffe, die auf Verfremdung basieren, induzieren zwar verstärkte Immunantworten, haben jedoch den großen Nachteil, dass die Immunstimulation gegen das Fremdepitop
- 30 dominiert und dass Immunantworten gegen das eigentliche Vakzinetarget z.T. nur moderat bleiben.

Eine weitere attraktive Möglichkeit ist die Fusion mit Sequenzen von Proteinen, die eine Translokation des Proteins in degradierende Zellkompartimente erlauben sollen. Diese Modifikationen führen jedoch, wie mittlerweile bekannt, nur zu einer mäßig verbesserten Stimulation von CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten und kaum zu einer Verstärkung von CD8<sup>+</sup>-Immunantworten [Wu, T. C. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 11671-11675; Bonini, C. et al., 2001, J. Immunol. 166: 5250-57, Su, Z. et al., 2002, Cancer Res. 62: 5041-5048].

Somit wäre es wünschenswert, über Impfstoffe zu verfügen, die die Antigenpräsentation und damit die Immunogenität gegen ein bestimmtes Antigen deutlich erhöhen. Es wäre weiterhin wünschenswert, Impfstoffe systematisch so modifizieren zu können, dass eine maximale Immunantwort durch CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten resultiert, ohne Fremdepitope einführen zu müssen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch den Gegenstand der Patentansprüche gelöst.

Erfindungsgemäß konnte festgestellt werden, dass Fusionsmoleküle, die Antigenmoleküle und Teile von Histokompatibilitätsantigenen umfassen, bei einer Verwendung als Impfstoffe eine um >100-fach gesteigerte Immunogenität gegenüber den unmodifizierten Antigenen aufweisen und dass überraschenderweise sowohl Immunantworten von CD4<sup>+</sup>- als auch CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in bisher noch nicht beschriebener Weise erhöht werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Fusionsmoleküle von Antigenmolekülen und die Verwendung derartiger Fusionsmoleküle.

In einem Aspekt betrifft die Erfindung ein Fusionsmolekül, das ein Antigen und die cytoplasmatische Region einer Kette eines MHC-Moleküls, bzw. ein

Antigen, eine Transmembranregion und die cytoplasmatische Region einer Kette eines MHC-Moleküls umfasst. Vorzugsweise sind sowohl die Transmembranregion als auch die cytoplasmatische Region von einem MHC-Molekül abgeleitet. Weiterhin umfasst das Fusionsmolekül vorzugsweise  
5 keine MHC-Bindedomäne.

Die Erfindung betrifft ferner ein Fusionsmolekül, das ein Antigen und eine Kette eines MHC-Moleküls oder einen Teil davon umfasst, wobei der Teil mindestens die Transmembranregion und die cytoplasmatische Region der  
10 Kette des MHC-Moleküls umfasst. Vorzugsweise umfasst der Teil der Kette eines MHC-Moleküls nicht die MHC-Bindedomäne oder Teile davon. Somit wird insbesondere ein Fusionsmolekül bereitgestellt, das ein Antigen und den Teil einer Kette eines MHC-Moleküls umfasst, der im Wesentlichen der Sequenz der Transmembranregion in Verbindung mit der cytoplasmatischen  
15 Region eines MHC-Moleküls entspricht, wobei der Begriff „Transmembranregion in Verbindung mit der cytoplasmatischen Region“ den Abschnitt einer Kette eines MHC-Moleküls betrifft, der mit dem N-terminalen Ende der Transmembranregion beginnt und mit dem C-terminalen Ende der cytoplasmatischen Region, insbesondere dem C-terminalen Ende der  
20 gesamten Kette des MHC-Moleküls abschließt. In dieser Ausführungsform entspricht die Verbindung der Transmembranregion mit der cytoplasmatischen Region der natürlich auftretenden Verbindung zwischen diesen Regionen.

25 Weiterhin wird erfindungsgemäß ein Fusionsmolekül bereitgestellt, das ein Antigen und eine Kette eines MHC-Moleküls oder einen Teil davon umfasst, wobei bei dem Teil im Wesentlichen die gesamten N-terminalen extrazellulären Domänen des MHC-Moleküls fehlen.

30 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bestehen die erfindungsgemäßen Fusionsmoleküle aus einer Fusion eines Antigens, gegebenenfalls mit einer Leitsequenz an seinem N-terminalen Ende, mit

einer Transmembranregion, vorzugsweise einer Transmembranregion einer Kette eines MHC-Moleküls, am C-terminalen Ende des Antigens und einer cytoplasmatischen Region einer Kette eines MHC-Moleküls am C-terminalen Ende der Transmembranregion.

5

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfassen die erfindungsgemäßen Fusionsmoleküle eine Leitsequenz, vorzugsweise eine Peptidsequenz mit Eigenschaften eines Sekretionssignals, das insbesondere in der Lage ist, die Translokation eines Proteins oder Peptids durch eine Membran zu steuern. Als Leitsequenz kann das Sekretionssignal jedes Typ-I Transmembranproteins genutzt werden, wobei der Begriff „Typ-I Transmembranprotein“ solche Transmembranproteine betrifft, deren C-Terminus im Cytoplasma lokalisiert ist. In einer besonderen Ausführungsform ist die Leitsequenz von einer Kette eines MHC-Moleküls abgeleitet. Vorzugsweise befindet sich die Leitsequenz am N-terminalen Ende der erfindungsgemäßen Fusionsmoleküle.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Fusionsmolekül, wobei im Wesentlichen die gesamten N-terminalen extrazellulären Domänen eines MHC-Moleküls durch ein Antigen mit einer Leitsequenz an dessen N-terminalen Ende ersetzt sind.

In einem erfindungsgemäßen Fusionsmolekül ist vorzugsweise das Antigen an seinem N-Terminus kovalent mit dem C-Terminus einer Leitsequenz verbunden und der C-Terminus des Antigenmoleküls ist mit dem N-Terminus der Transmembranregion verbunden, die ihrerseits am C-Terminus mit dem N-Terminus der cytoplasmatischen Region eines MHC-Moleküls verbunden ist.

Somit weist das erfindungsgemäße Fusionsmolekül vorzugsweise folgende Anordnung auf: N-Terminus-Leitsequenz/Antigen/Transmembranregion /cytoplasmatische Region-C-Terminus.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform besteht das erfindungsgemäße Fusionsmolekül im Wesentlichen aus der Leitsequenz, dem Antigen, der Transmembranregion und der cytoplasmatischen Region.

5

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Antigen ein Peptid, Polypeptid oder Protein und das erfindungsgemäße Fusionsmolekül ist ein Protein oder Polypeptid.

10 In einer Ausführungsform sind mehrere Antigene, die gleich oder verschieden sein können, in dem erfindungsgemäßen Fusionsmolekül vorhanden, d.h. mindestens 2, vorzugsweise 2 bis 10, mehr bevorzugt 2 bis 5, noch mehr bevorzugt 2 bis 3, insbesondere 2 Antigene. Diese mehrfach gekoppelten Antigene können getrennt voneinander oder in Serie  
15 nacheinander, gegebenenfalls durch einen Linker getrennt, als Tandemkonstrukte vorliegen. Vorzugsweise wird dadurch bei Verabreichung eine Immunreaktion gegen verschiedene Antigene ausgelöst.

Das Antigen kann vollständig oder verkürzt sein, d.h. es enthält nur einen  
20 Teil des natürlichen Proteins oder Polypeptids, das als Antigen dient.

Vorzugsweise sind die Leitsequenz und/oder die Transmembranregion der erfindungsgemäßen Fusionsmoleküle von MHC-Molekülen, insbesondere der Klasse I oder II abgeleitet. Mehr bevorzugt sind die Leitsequenz und/oder die  
25 Transmembranregion und/oder die cytoplasmatische Region der erfindungsgemäßen Fusionsmoleküle von MHC-Molekülen, insbesondere der Klasse I oder II abgeleitet.

Erfindungsgemäß können auch eine oder mehrere, vorzugsweise flexible  
30 Linkersequenzen (Verbindungssequenzen) in dem Fusionsmolekül vorhanden sein, die zwischen der Leitsequenz und dem Antigen, zwischen dem Antigen und der Transmembranregion und/oder zwischen der



Transmembranregion und der cytoplasmatischen Region liegen können. Vorzugsweise umfasst erfindungsgemäß eine Linkersequenz etwa 7 bis 20 Aminosäuren, besser etwa 8 bis 16 Aminosäuren, und insbesondere etwa 8 bis 12 Aminosäuren.

5

In erfindungsgemäßen Fusionsmolekülen ist die Linkersequenz vorzugsweise flexibel und hält so das damit verbundene Peptid nicht in einer einzigen, ungewünschten Konformation. Der Linker umfasst vorzugsweise vor allem Aminosäuren mit kleinen Seitenketten wie Glycin, Alanin und Serin, um eine Flexibilität zu ermöglichen. Vorzugsweise enthält die Linkersequenz keinen Prolinrest, der die Flexibilität hemmen könnte.

10

In einer weiteren Ausführungsform sind die Leitsequenz, das Antigen, die Transmembranregion und/oder die cytoplasmatische Region direkt ohne einen Linker miteinander verbunden.

15

Die Leitsequenz weist vorzugsweise die in SEQ ID NO: 2 gezeigte Sequenz oder eine davon abgeleitete Sequenz auf bzw. wird durch die in SEQ ID NO: 1 gezeigte Sequenz oder eine davon abgeleitete Sequenz kodiert. Die Transmembran-cytoplasmatische Region weist vorzugsweise die in SEQ ID NO: 4 bzw. 6 gezeigte Sequenz oder eine davon abgeleitete Sequenz auf und wird durch die in SEQ ID NO: 3 bzw. 5 gezeigte Sequenz oder eine davon abgeleitete Sequenz kodiert.

20

In weiteren bevorzugten Ausführungsformen ist die Transmembran-cytoplasmatische bzw. die ausschließlich cytoplasmatische Region von sequenzverwandten MHC-Molekülen (u.a. HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-DRA, HLA-DRB, HLA-DQA, HLA-DQB, HLA-DPA, HLA-DPB, CD1a, CD1b, CD1c) abgeleitet. Bevorzugte Transmembran-cytoplasmatische Regionen weisen eine Sequenz auf, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den in SEQ ID NO: 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 dargestellten Sequenzen und davon abgeleiteten Sequenzen. In weiteren

30

Ausführungsformen weisen die ausschließlich cytoplasmatischen Regionen eine Sequenz auf, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den in SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 dargestellten Sequenzen und davon abgeleiteten Sequenzen. In weiteren Ausführungsformen ist auch die Verwendung von abgewandelten Sequenzen, z.B. modifizierten oder orthologen Sequenzen aus anderen Organismen, vorgesehen. Besonders bevorzugt sind dabei Sequenzen, die am C-terminalen Ende eine Homologie von mehr als 60% zu den in SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 gezeigten Sequenzen aufweisen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weist das erfindungsgemäße Fusionsmolekül die in SEQ ID NO: 12 bzw. 14 gezeigte Aminosäuresequenz oder eine davon abgeleitete Sequenz auf.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Fusionsmolekül, umfassend ein Antigen und ein SNARE-Protein (insbesondere Cis-golgi SNARE p28, VTI1b, Membrin, Pallidin, Syntaxin-5, Syntaxin-6, Syntaxin-7, Syntaxin-8, Syntaxin-10, SYNTAXIN-10a, Syntaxin-11, Syntaxin-12, Syntaxin-17, VAMP-2, VAMP-3, VAMP-4, VAMP-7, VAMP8, VTI1-a-beta, XP350893, LIP5 (SEQ ID NO: 43-63)) bzw. eine Sequenz, welche ein oder mehrere SNARE-Motive beinhaltet. Durch Fusion eines Antigens mit einem SNARE-Protein oder SNARE-Motiv (bevorzugt am C-Terminus des SNARE-Proteins oder -Motivs) kann der Transport des Antigens gezielt in ein definiertes Kompartiment erfolgen (z.B. Lysosomen und Endosomen). Durch einen derartigen gezielten Transport können ferner immunogene Epitope des Antigens in einem Kompartiment generiert und präsentiert werden, was experimentell feststellbar ist.

SNARE-Proteine sind membranständige Proteine, deren gemeinsames Merkmal das 60-70 Aminosäuren umfassende SNARE-Motiv ist. SNARE-Proteine sind funktionell in dem Transport und der Fusion von Vesikeln in

der Zelle involviert. Eukaryontische Organismen verfügen über eine Vielzahl verschiedener SNARE-Proteine, die mit unterschiedlichen Vesikelmembranen in der Zelle (u.a. Endosomen-, Lysosomen-, Golgi-, Plasmamembran) assoziiert sind. Die cytoplasmatischen Regionen der SNARE-Proteine üben eine Doppelfunktion aus. Zum einen dienen sie als „Trafficking“-Signale (Adressetiketten), die den Zielort des Proteins und der dazugehörigen Membran vorgeben. Zum anderen können die Domänen durch Hetero- und Homoassoziation (Zusammenlagerung) zur Verschmelzung unterschiedlicher Vesikel (z.B. Endosomen mit Lysosomen) beitragen.

Erfindungsgemäß können auch die SNARE-Antigen-Fusionsmoleküle Linkersequenzen zwischen dem SNARE-Anteil und dem Antigenanteil beinhalten. Ferner sind bezüglich des Antigens und der Linkersequenz der SNARE-Antigen-Fusionsmoleküle alle vorstehend beschriebenen Ausführungsformen umfasst. Bezüglich der SNARE-Antigen-Fusionsmoleküle umfasst ein Linker vorzugsweise 80-120 Aminosäuren. In einer besonderen Ausführungsform beinhaltet der Linker eine Transmembranregion. Somit betrifft die Erfindung Fusionsmoleküle, die ein SNARE-Protein oder ein SNARE-Motiv in Fusion mit einem Antigen oder einer Transmembranregion und einem Antigen umfassen. Solche Fusionsmoleküle sind beispielsweise in Abbildung 7 gezeigt.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung Nukleinsäuren und Derivate davon, die für die oben beschriebenen Fusionsmoleküle kodieren und vorzugsweise diese Fusionsmoleküle exprimieren können. Im folgenden umfasst der Begriff „Nukleinsäure“ auch die Derivate davon.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die Nukleinsäure, die für ein erfindungsgemäßes Fusionsmolekül kodiert, die in SEQ ID NO: 11 bzw. 13 gezeigte Nukleinsäuresequenz oder eine davon abgeleitete Sequenz.

Die Erfindung betrifft auch Wirtszellen, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten.

Die Wirtszelle kann ferner eine Nukleinsäure umfassen, die für ein HLA-Molekül kodiert. In einer Ausführungsform exprimiert die Wirtszelle das HLA-Molekül endogen. In einer weiteren Ausführungsform exprimiert die Wirtszelle das HLA-Molekül rekombinant. Vorzugsweise ist die Wirtszelle nicht-proliferativ. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Wirtszelle eine Antigen-präsentierende Zelle, insbesondere eine dendritische Zelle, ein Monozyt oder ein Makrophage.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, insbesondere eine Vakzine, die ein oder mehrere der erfindungsgemäßen Fusionsmoleküle oder eine oder mehrere der dafür kodierenden Nukleinsäuren umfasst.

In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß ein Verfahren zur Erhöhung der Menge an MHC/Peptid-Komplexen in einer Zelle bereitgestellt, wobei das Verfahren die Bereitstellung eines erfindungsgemäßen Fusionsmoleküls oder einer dafür kodierenden Nukleinsäure für die Zelle umfasst. Vorzugsweise befindet sich die Zelle in einem Lebewesen und das Verfahren umfasst die Verabreichung eines erfindungsgemäßen Fusionsmoleküls oder einer dafür kodierenden Nukleinsäure an das Lebewesen.

In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß ein Verfahren zur Steigerung der Präsentation von Zelloberflächenmolekülen auf Zellen bereitgestellt, die in der Lage sind, Antigene zu präsentieren (wie B-Zellen und Makrophagen, im Allgemeinen „APC“ genannt). Die Verstärkung der Antigen-präsentierenden Aktivität solcher Zellen erfolgt durch Bereitstellung eines erfindungsgemäßen Fusionsmoleküls oder einer dafür kodierenden Nukleinsäure für die Zellen. Eine derartige Verstärkung der Antigen-

präsentierenden Aktivität verstärkt wiederum vorzugsweise die primäre Aktivierung von T-Zellen, insbesondere von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten, die gegenüber dem Antigen reagieren. Vorzugsweise befindet sich die Zelle in einem Lebewesen und das Verfahren umfasst die Verabreichung eines  
5 erfindungsgemäßen Fusionsmoleküls oder einer dafür kodierenden Nukleinsäure an das Lebewesen.

In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß ein Verfahren zum Auslösen einer Immunreaktion bei einem Lebewesen bereitgestellt, wobei das  
10 Verfahren die Verabreichung eines erfindungsgemäßen Fusionsmoleküls oder einer dafür kodierenden Nukleinsäure an das Lebewesen umfasst.

In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß ein Verfahren zur Stimulierung oder Aktivierung von T-Zellen, insbesondere CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-  
15 Lymphozyten, in einem Lebewesen bereitgestellt, wobei das Verfahren die Verabreichung eines erfindungsgemäßen Fusionsmoleküls oder einer dafür kodierenden Nukleinsäure an das Lebewesen umfasst.

In einem weiteren Aspekt wird ein Verfahren zur Behandlung, Vakzinierung  
20 oder Immunisierung eines Lebewesens bereitgestellt, wobei das Verfahren die Verabreichung eines erfindungsgemäßen Fusionsmoleküls oder einer dafür kodierenden Nukleinsäure an das Lebewesen umfasst. Dabei werden insbesondere solche Antigene in dem erfindungsgemäßen Fusionsmolekül  
oder der dafür kodierenden Nukleinsäure eingesetzt, die ohne die  
25 erfindungsgemäße Veränderung als für die beabsichtigte Behandlung, Vakzinierung oder Immunisierung wirksam bekannt sind.

Die vorstehend beschriebenen Verfahren eignen sich insbesondere für eine  
Behandlung oder Prophylaxe von infektiösen Erkrankungen, die  
30 beispielsweise von Bakterien oder Viren verursacht werden. In bestimmten Ausführungsformen ist das erfindungsgemäß verwendete Antigen von einem infektiösen Erreger wie Hepatitis A, B, C, HIV, Mykobakterien,

Malariaerreger, Erreger von SARS, Herpesvirus, Influenzavirus, Poliovirus bzw. von bakteriellen Erregern wie Chlamydien und Mykobakterien abgeleitet. Eine besonders nützliche Anwendung der vorliegenden Erfindung liegt in der Krebs-Immuntherapie oder -Vakzinierung, wo insbesondere eine Aktivierung von Tumorantigen-reaktiven T-Zellen verstärkt wird, wodurch die Aussicht für eine T-Zell-Immuntherapie oder -Vakzinierung gegen Tumorzellen verbessert wird.

In spezifischen Ausführungsformen ist das erfindungsgemäß verwendete Antigen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den folgenden Antigenen: ART-4, BAGE, ss-Catenin/m, Bcr-abL CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, CLAUDIN-12, c-MYC, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gap100, HAGE, HER-2/neu, HPV-E7, HPV-E6, HAST-2, hTERT (oder hTRT), LAGE, LDLR/FUT, MAGE-A, MAGE-B, MAGE-C, MART-1/Melan-A, MC1R, Myosin/m, MUC1, MUM-1, -2, -3, NA88-A, NF1, NY-ESO-1, NY-BR-1, p190 minor bcr-abL Pml/RARa, PRAME, Proteinase-3, PSA, PSM, RAGE, RU1 oder RU2, SAGE, SART-1 oder SART-3, SCGB3A2, SCP1, SCP2, SCP3, SSX, SURVIVIN, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, TPTE und WT.

### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Die Begriffe „Domäne“ oder „Region“ betreffen einen bestimmten Teil einer Aminosäuresequenz, der vorzugsweise mit einer bestimmten Funktion oder Struktur in Zusammenhang gebracht werden kann. Zum Beispiel weisen die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Polypeptide eines MHC-Klasse II-Moleküls zwei Domänen,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  bzw.  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ , eine Transmembranregion und eine cytoplasmatische Region auf. In ähnlicher Weise weist die  $\alpha$ -Kette von MHC-Klasse I-Molekülen drei Domänen,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$ , eine Transmembranregion und eine cytoplasmatische Region auf.

In einer Ausführungsform wird bei einer Auswahl der Sequenz einer bestimmten Domäne oder Region für eine Deletion oder einen Einbau in ein erfindungsgemäßes Fusionsmolekül die gesamte Domäne oder Region umfasst. Um dieses sicherzustellen, kann die Sequenz der betreffenden Domäne oder Region verlängert sein, um Teile eines Linkers oder sogar Teile der benachbarten Domäne oder Region zu beinhalten. Der Begriff „im Wesentlichen“ in Bezug auf eine Domäne oder Region ist in diesem Sinne zu verstehen.

Der Begriff „Transmembranregion“ betrifft den Teil eines Proteins, der im Wesentlichen den sich in einer zellulären Membran befindlichen Anteil ausmacht und vorzugsweise einer Verankerung des Proteins in der Membran dient. Vorzugsweise ist erfindungsgemäß eine Transmembranregion eine Aminosäuresequenz mit einem einzelnen Durchtritt durch die Membran. Jedoch kann in bestimmten Ausführungsformen auch eine Transmembranregion verwendet werden, die mehr als einen Durchtritt durch die Membran aufweist. Die Transmembranregion wird im Allgemeinen 15-25 vorzugsweise hydrophobe ungeladene Aminosäuren aufweisen, die beispielsweise eine  $\alpha$ -helikale Konformation einnehmen. Vorzugsweise ist die Transmembranregion von einem Protein, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus MHC-Molekülen, Immunglobulinen, CD4, CD8, der CD3- $\zeta$ -Kette, der CD3- $\gamma$ -Kette, der CD3- $\delta$ -Kette und der CD3- $\epsilon$ -Kette abgeleitet.

Typischerweise besteht die Transmembranregion im Fall der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des MHC Klasse II-Moleküls aus etwa 20 hydrophoben Aminosäuren, die mit dem Carboxy-terminalen Ende des Antigens verbunden sind. Diese Reste erlauben ein Überspannen der Membran durch das Protein. Die Transmembranregion endet mit etwa 6-32 Resten, die den cytoplasmatischen Schwanz umfassen, am Carboxy-terminalen Ende einer jeden dieser Ketten. Es wurde gezeigt, dass diese Transmembran- und cytoplasmatischen Regionen durch Sequenzen ersetzt werden können, die eine GPI-Bindung signalisieren, und dass die chimären GPI-verankerten

Klasse II-Moleküle Membran-gebunden sind (Wettstein, D.A., J.J. Boniface, P.A. Reay, H. Schild und M.M. Davis, 1991, J. Exp. Med. 174:219-228). Solche Ausführungsformen sind erfindungsgemäß von dem Begriff „Transmembranregion“ umfasst. GPI-gebundene Membran-Ankerdomänen wurden in einer Reihe von Proteinen definiert, einschließlich Verfallbeschleunigender Faktor (decay accelerating factor; DAF), CD59 und menschlicher placentaler alkalischer Phosphatase (HPAP) (Wettstein, D.A., J.J. et al., 1991, J. Exp. Med. 174:219-228). Zum Beispiel sind die 38 Carboxy-terminalen Aminosäuren von HPAP ausreichend für eine Funktion als Signalsequenz für eine Bindung von GPI. Falls die für diese Domäne kodierende DNA-Sequenz mit einem sekretierten Molekül, wie dem löslichen Teil der MHC Klasse II- $\alpha$ - oder - $\beta$ -Kette verbunden wird, bildet sich ein Membran-gebundenes chimäres Molekül (Wettstein, D.A. et al., 1991, J. Exp. Med. 174:219-228) und ein derartiges Verfahren kann für die Verankerung von Fusionsmolekülen der Erfindung an eine Zellmembran eingesetzt werden.

Der Begriff „Haupt-Histokompatibilitätskomplex“ und die Abkürzung „MHC“ betreffen einen Komplex von Genen, der in allen Vertebraten auftritt. MHC-Proteine oder -Moleküle fungieren bei einer Signalgebung zwischen Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen in normalen Immunreaktionen dadurch, dass sie Peptide binden und sie für eine mögliche Erkennung durch T-Zell-Rezeptoren (TCR) präsentieren. MHC-Moleküle binden Peptide in einem intrazellulären Prozessierungskompartiment und präsentieren diese Peptide auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen gegenüber T-Zellen. Die menschliche MHC-Region, auch als HLA bezeichnet, findet sich auf Chromosom 6 und beinhaltet die Klasse I-Region und die Klasse II-Region.

Der Begriff „MHC-Klasse I“ oder „Klasse I“ betrifft die Haupt-Histokompatibilitätskomplex-Klasse I-Proteine oder -Gene. Innerhalb der



MHC-Klasse I-Region finden sich beim Menschen die HLA-A-, HLA-B-, HLA-C-, HLA-E-, HLA-F-, CD1a-, CD1b- und CD1c-Unterregionen.

Die  $\alpha$ -Ketten der Klasse I sind Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von etwa 44 kDa. Die Polypeptidkette ist etwas über 350 Aminosäurereste lang. Sie kann in drei funktionelle Regionen unterteilt werden: eine externe, eine transmembranöse und eine cytoplasmatische Region. Die externe Region ist 283 Aminosäurereste lang und in drei Domänen,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$ , unterteilt. Die Domänen und Regionen werden gewöhnlich von separaten Exons des Klasse I-Gens kodiert. Die transmembrane Region umspannt die Lipid-Doppelschicht der Plasmamembran. Sie besteht aus 23 zumeist hydrophoben Aminosäureresten, die in einer  $\alpha$ -Helix angeordnet sind. Die cytoplasmatische Region ist typischerweise 32 Aminosäurereste lang und hat die Fähigkeit, mit den Elementen des Cytoskeletts zu interagieren. Die  $\alpha$ -Kette interagiert mit  $\beta 2$ -Mikroglobulin und bildet so  $\alpha$ - $\beta 2$ -Dimere auf der Zelloberfläche.

Der Begriff „MHC-Klasse II“ oder „Klasse II“ betrifft die Haupt-Histokompatibilitätskomplex-Klasse II-Proteine oder -Gene. Innerhalb der MHC-Klasse II-Region finden sich im Menschen die DP-, DQ- und DR-Subregionen für Klasse II- $\alpha$ -Ketten- und - $\beta$ -Ketten-Gene (d.h. DP $\alpha$ , DP $\beta$ , DQ $\alpha$ , DQ $\beta$ , DR $\alpha$  und DR $\beta$ ).

Klasse II-Moleküle sind Heterodimere, die aus je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette bestehen. Beide Ketten sind Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 31-34 kDa ( $\alpha$ ) oder 26-29 kDa ( $\beta$ ). Die Gesamtlänge der  $\alpha$ -Ketten variiert von 229 bis 233 Aminosäureresten, die der  $\beta$ -Ketten von 225 bis 238 Resten. Sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Ketten bestehen aus einer externen Region, einem verbindenden Peptid, einer transmembranösen Region und einem cytoplasmatischen Schwanz. Die externe Region besteht aus zwei Domänen,  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  oder  $\beta 1$  und  $\beta 2$ . Das verbindende Peptid ist in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten 13 bzw. 9 Reste lang. Es verbindet die zweite Domäne mit der

transmembranösen Region, die sowohl in  $\alpha$ - als auch in  $\beta$ -Ketten aus 23 Aminosäureresten besteht. Die Länge der cytoplasmatischen Region variiert von 3 bis 16 Resten in  $\alpha$ -Ketten und von 8 bis 20 Resten in  $\beta$ -Ketten.

5 Erfindungsgemäß betrifft der Begriff „Kette eines MHC-Moleküls“ die  $\alpha$ -Kette eines MHC-Klasse I-Moleküls bzw. die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten eines MHC-Klasse II-Moleküls. Die  $\alpha$ -Ketten eines MHC-Klasse I-Moleküls, von denen die erfindungsgemäßen Fusionsmoleküle abgeleitet sein können, umfassen die HLA-A-, -B- und -C- $\alpha$ -Ketten. Die  $\alpha$ -Ketten eines MHC-Klasse II-Moleküls,  
 10 von denen die erfindungsgemäßen Fusionsmoleküle abgeleitet sein können, umfassen HLA-DR-, -DP- und -DQ- $\alpha$ -Ketten, insbesondere HLA-DR1-, HLA-DR2-, HLA-DR4-, HLA-DQ1-, HLA-DQ2- und HLA-DQ8- $\alpha$ -Ketten und insbesondere  $\alpha$ -Ketten, die von DRA\*0101-, DRA\*0102-, DQA1\*0301- oder DQA1\*0501-Allelen kodiert werden. Die  $\beta$ -Ketten eines MHC-Klasse II-Moleküls, von denen die erfindungsgemäßen Fusionsmoleküle abgeleitet sein  
 15 können, umfassen HLA-DR-, -DP- und -DQ- $\beta$ -Ketten, insbesondere HLA-DR1-, HLA-DR2-, HLA-DR4-, HLA-DQ1-, HLA-DQ2- und HLA-DQ8- $\beta$ -Ketten und insbesondere  $\beta$ -Ketten, die von DRB1\*01-, DRB1\*15-, DRB1\*16-, DRB5\*01-, DQB1\*03- und DQB1\*02-Allelen kodiert werden.

20

Der Begriff, „MHC-Bindedomäne“ betrifft die „MHC-Klasse I-Bindedomäne“ und „MHC-Klasse II-Bindedomäne“.

Der Begriff „MHC-Klasse I-Bindedomäne“ betrifft die Region eines MHC-Klasse I-Moleküls oder einer MHC-Klasse I-Kette, die für eine Bindung an  
 25 ein antigenes Peptid notwendig ist. Eine MHC-Klasse I-Bindedomäne wird vorwiegend durch die  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domänen der MHC-Klasse I- $\alpha$ -Kette gebildet. Obwohl die  $\alpha$ 3-Domäne der  $\alpha$ -Kette und  $\beta$ 2-Mikroglobulin keine essentiellen Teile der Bindedomäne darstellen, sind sie vermutlich für eine  
 30 Stabilisierung der Gesamtstruktur des MHC-Klasse I-Moleküls wichtig und daher schließt der Begriff „MHC-Klasse I-Bindedomäne“ diese Regionen vorzugsweise ein. Eine MHC-Klasse I-Bindedomäne kann auch im

Wesentlichen als die extrazelluläre Domäne eines MHC-Klasse I-Moleküls definiert werden, was sie von den Transmembran- und cytoplasmatischen Regionen unterscheidet.

- 5 Der Begriff „MHC-Klasse II-Bindedomäne“ betrifft die Region eines MHC-Klasse II-Moleküls oder einer MHC-Klasse II-Kette, die für die Bindung an ein antigenes Peptid notwendig ist. Eine MHC-Klasse II-Bindedomäne wird vorwiegend durch die  $\alpha 1$ - und  $\beta 1$ -Domänen der MHC-Klasse II- $\alpha$ - und - $\beta$ -Ketten gebildet. Die  $\alpha 2$ - und  $\beta 2$ -Domänen dieser Proteine sind vermutlich  
 10 jedoch auch für eine Stabilisierung der Gesamtstruktur der MHC-Bindegrube wichtig und daher schließt der Begriff „MHC-Klasse II-Bindedomäne“ erfindungsgemäß vorzugsweise diese Regionen ein. Eine MHC-Klasse II-Bindedomäne kann auch im Wesentlichen als die extrazelluläre Domäne eines MHC-Klasse II-Moleküls definiert werden, was  
 15 sie von der Transmembran- und cytoplasmatischen Domäne unterscheidet.

- Die genaue Anzahl an Aminosäuren in den verschiedenen MHC-Moleküldomänen oder -Regionen variiert abhängig von der Säugerspezies sowie zwischen Genklassen innerhalb einer Spezies. Bei einer Auswahl der  
 20 Aminosäuresequenz einer bestimmten Domäne oder Region ist vielmehr die Aufrechterhaltung der Funktion der Domäne oder Region wichtig als die genaue strukturelle Definition, die auf der Anzahl von Aminosäuren basiert. Ferner ist dem Fachmann bekannt, dass die Funktion auch aufrechterhalten werden kann, wenn etwas weniger als die gesamte Aminosäuresequenz der  
 25 ausgewählten Domäne oder Region verwendet wird.

- Der Begriff „Antigen“ betrifft ein Agens, gegen das eine Immunreaktion erzeugt werden soll. Der Begriff „Antigen“ umfasst insbesondere Proteine; Peptide, Polysaccharide, Nukleinsäuren insbesondere RNA und DNA sowie  
 30 Nukleotide. Der Begriff „Antigen“ umfasst auch derivatisierte Antigene als erst durch Umwandlung (z.B. intermediär im Molekül, durch Komplettierung mit Körpereiwiss) antigen werdende – und sensibilisierende –

Sekundärsubstanz und konjugierte Antigene, die durch künstlichen Einbau von Atomgruppen (z.B. Isocyanate, Diazoniumsalze) eine neue konstitutive Spezifität aufweisen. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Antigen ein Tumorantigen, d.h. ein Bestandteil von Krebszellen, die dem Cytoplasma, der Zelloberfläche und dem Zellkern entstammen können, insbesondere diejenigen, die intrazellulär oder als Oberflächenantigene an Tumorzellen vorzugsweise vermehrt entstehenden Antigene. Beispiele sind das karzinoembryonale Antigen,  $\alpha$ 1-Fetoprotein, Isoferritin und fetales Sulfoglykoprotein,  $\alpha$ 2-H-Ferroprotein und  $\gamma$ -Fetoprotein und verschiedene Virustumorantigene. In einer weiteren Ausführungsform ist das Antigen ein Virusantigen wie virale Ribonukleoproteine oder Hüllproteine. Insbesondere sollte das Antigen oder Peptide davon von MHC-Molekülen präsentiert werden und dadurch zur Modulation, insbesondere Aktivierung von Zellen des Immunsystems, vorzugsweise CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten, insbesondere über die Modulation der Aktivität eines T-Zell-Rezeptors fähig sein und somit vorzugsweise die T-Zell-Vermehrung induzieren.

Der Begriff „MHC/Peptid-Komplex“ betrifft einen nicht-kovalenten Komplex der Binde-domäne eines MHC-Klasse I- bzw. MHC-Klasse II-Moleküls und eines MHC-Klasse I- bzw. MHC-Klasse II-Bindepeptids.

Der Begriff „MHC-Bindepeptid“ oder „bindendes Peptid“ betrifft ein Peptid, das an ein MHC-Klasse I- und/oder ein MHC-Klasse II-Molekül bindet. Im Fall von Klasse I-MHC/Peptid-Komplexen sind die Bindepeptide typischerweise 8-10 Aminosäuren lang, obwohl längere oder kürzere Peptide wirksam sein können. Im Fall von Klasse II-MHC/Peptid-Komplexen sind die Bindepeptide typischerweise 10-25 Aminosäuren lang und insbesondere 13-18 Aminosäuren lang, obwohl längere und kürzere Peptide wirksam sein können.

Erfindungsgemäße Fusionsmoleküle und die dafür kodierenden Nukleinsäuren können im Allgemeinen durch rekombinante DNA-Techniken

wie Herstellung von Plasmid-DNA, Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen, Ligation von DNA, Transformation oder Transfektion eines Wirts, Kultivierung des Wirts und Isolierung und Reinigung des exprimierten Fusionsmoleküls hergestellt werden. Solche Verfahren sind  
 5 bekannt und z.B. in Sambrook et al., Molecular Cloning, (2. Auflage, 1989) beschrieben.

Für das Antigen kodierende DNA kann durch Isolation von DNA aus natürlichen Quellen oder durch bekannte Syntheseverfahren wie dem  
 10 Phosphatdiesterverfahren erhalten werden; vgl. z.B. Oligonucleotide Synthesis, IRL Press (M.J. Gait, Hrsg., 1984). Synthetische Oligonukleotide können auch mit Hilfe käuflich erhältlicher automatischer Oligonukleotid-Synthesegeräte hergestellt werden.

15 Die Anteile von MHC-Moleküle der erfindungsgemäßen Fusionsmoleküle entsprechen in Bezug auf die Aminosäuresequenz in geeigneter Weise natürlich vorkommenden MHC-Molekülen von Mensch, Maus oder anderen Nagern oder anderen Säugern oder sind Derivate davon.

20 Für MHC-Proteine kodierende DNA-Quellen sind bekannt, wie menschliche lymphoblastoide Zellen. Nach einer Isolierung kann das für das MHC-Molekül kodierende Gen oder ein interessierender Teil davon durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder andere bekannte Verfahren amplifiziert werden. Geeignete PCR-Primer für die Amplifikation des Gens für  
 25 das MHC-Peptid können Restriktionsstellen an das PCR-Produkt anfügen.

Vorzugsweise werden erfindungsgemäß DNA-Konstrukte hergestellt, die für die Leitsequenz, die Transmembranregion und die cytoplasmatische Region kodierende Nukleinsäuresequenzen umfassen und die eine  
 30 Restriktionsschnittstelle zwischen der Leitsequenz und der Transmembranregion enthalten, so dass im Wesentlichen jede für ein

interessierendes Antigen kodierende Nukleotidsequenz in das Konstrukt eingebunden werden kann.

In einem bevorzugten Verfahren zur Herstellung erfindungsgemäßer Fusionsmoleküle werden DNA-Sequenzen so angeordnet, dass das C-terminale Ende der Leitsequenz an das N-terminale Ende des Antigens, das C-terminale Ende des Antigens an das N-terminale Ende der Transmembranregion, und das C-terminale Ende der Transmembranregion an das N-terminale Ende der cytoplasmatischen Region gebunden ist. Wie vorstehend erörtert, werden vorzugsweise Restriktionsschnittstellen zwischen das Ende der Leitsequenz und den Anfang der Transmembranregion eingebaut, so dass im Wesentlichen jede Nukleinsäure, die für ein interessierendes Antigen kodiert, an die Nukleinsäuresequenz für die Transmembranregion gebunden werden kann.

Ein exprimiertes erfindungsgemäßes Fusionsmolekül kann isoliert und in an sich bekannter Weise gereinigt werden. Typischerweise wird das Kulturmedium zentrifugiert und der Überstand sodann durch Affinitäts- oder Immunoaffinitätsverfahren, umfassend die Verwendung von monoklonalen Antikörpern, die an das exprimierte Fusionsmolekül binden, gereinigt. Das Fusionsmolekül kann auch eine Sequenz enthalten, die die Reinigung unterstützt, z.B. ein 6xHis-Tag.

Die Fähigkeit eines erfindungsgemäßen Fusionsmoleküls, die Aktivität eines T-Zell-Rezeptors zu modulieren (einschließlich Inaktivierung der T-Zell-Reaktionen) kann einfach durch einen in vitro-Test bestimmt werden. Typischerweise werden T-Zellen für die Tests durch transformierte T-Zelllinien bereitgestellt, wie T-Zell-Hybridome oder T-Zellen, die aus einem Säuger wie einem Menschen oder einem Nagetier wie einer Maus isoliert werden. Geeignete T-Zell-Hybridome sind frei verfügbar oder können in an sich bekannter Weise hergestellt werden. T-Zellen können in an sich

bekannter Weise aus einem Säuger isoliert werden; vgl. z.B. Shimonkevitz, R. et al., 1983, J. Exp. Med. 158:303.

Ein geeigneter Test zur Bestimmung, ob ein erfindungsgemäßes Fusionsmolekül zur Modulation der Aktivität von T-Zellen fähig ist, erfolgt wie folgt durch die nachstehenden Schritte 1-4. T-Zellen exprimieren in geeigneter Weise einen Marker, der getestet werden kann und der T-Zell-Aktivierung oder Modulation der T-Zell-Aktivität nach Aktivierung anzeigt. So kann das Maus-T-Zell-Hybridom DO11.10, das Interleukin-2 (IL-2) bei einer Aktivierung exprimiert, verwendet werden. IL-2-Konzentrationen können gemessen werden, um zu bestimmen, ob ein spezifisches präsentierendes Peptid zur Modulation der Aktivität dieses T-Zell-Hybridoms fähig ist. Ein derartiger geeigneter Test erfolgt durch die nachstehenden Schritte:

1. T-Zellen werden z.B. aus einem interessierenden T-Zell-Hybridom oder durch Isolierung aus einem Säuger erhalten.
2. Die T-Zellen werden unter Bedingungen kultiviert, die eine Vermehrung erlauben.
3. Die wachsenden T-Zellen werden mit Antigen-präsentierenden Zellen in Kontakt gebracht, die ihrerseits mit einem erfindungsgemäßen Fusionsmolekül oder einer dafür kodierenden Nukleinsäure in Kontakt gebracht wurden.
4. Die T-Zellen werden auf einen Marker getestet, z.B. wird die IL-2-Produktion gemessen.

Die in den Tests verwendeten T-Zellen werden unter für eine Vermehrung geeigneten Bedingungen inkubiert. Zum Beispiel wird ein DO11.10-T-Zell-Hybridom geeigneterweise bei etwa 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Vollmedium (RPMI 1640, supplementiert mit 10% FBS, Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin

und  $5 \times 10^{-5}$  M 2-Mercaptoethanol) inkubiert. Serielle Verdünnungen des erfindungsgemäßen Fusionsmoleküls können getestet werden. T-Zell-Aktivierungssignale werden durch Antigen-präsentierende Zellen bereitgestellt, die mit dem geeigneten antigenen Peptid beladen worden waren.

Alternativ zu der Messung eines exprimierten Proteins wie IL-2 kann die Modulation der T-Zell-Aktivierung geeigneter Weise durch Veränderungen der Vermehrung von Antigen-abhängigen T-Zellen, wie gemessen durch bekannte Radiomarkierungsverfahren, bestimmt werden. Zum Beispiel kann ein markiertes (wie tritiert) Nukleotid in ein Testkulturmedium eingebracht werden. Das Einbringen eines derartigen markierten Nukleotids in die DNA dient als Messgröße für die T-Zell-Vermehrung. Dieser Test ist nicht für T-Zellen geeignet, die keiner Antigen-Präsentation für das Wachstum bedürfen, wie T-Zell-Hybridome. Der Test ist für die Messung der Modulation von T-Zell-Aktivierung durch Fusionsmoleküle im Fall von nicht-transformierten T-Zellen, die aus Säugern isoliert wurden, geeignet.

Die Fähigkeit eines erfindungsgemäßen Fusionsmoleküls, eine Immunreaktion zu induzieren, einschließlich eine Vakzinierung gegen eine Zielerkrankung zu ermöglichen, kann einfach durch einen in vivo-Test bestimmt werden. Zum Beispiel kann ein erfindungsgemäßes Fusionsmolekül oder eine dafür kodierende Nukleinsäure an einen Säuger wie eine Maus verabreicht werden und Blutproben aus dem Säuger zum Zeitpunkt der ersten Verabreichung und mehrfach in periodischen Zeiträumen danach (wie 1, 2, 5 und 8 Wochen nach Verabreichung des Fusionsmoleküls oder der dafür kodierenden Nukleinsäure) entnommen werden. Serum wird aus den Blutproben gewonnen und auf das Auftreten von durch die Immunisierung entstandenen Antikörpern getestet. Antikörperkonzentrationen können bestimmt werden. Daneben können aus dem Blut bzw. aus lymphatischen Organen T-Lymphozyten isoliert werden und funktionell auf Reaktivität gegen das Antigen bzw. von dem Antigen



abgeleitete Epitope getestet werden. Alle dem Fachmann bekannten „Readout“-Systeme u.a. Proliferationsassay, Zytokinsekretion, zytotoxische Aktivität, Tetrameranalyse können hierbei verwendet werden.

5 Erfindungsgemäße Verfahren für die Induktion einer Immunreaktion, einschließlich der Vakzinierung eines Lebewesens gegen eine Zielerkrankung, können in Kombination mit bekannten Verfahren für die Induktion einer Immunreaktion verwendet werden. Zum Beispiel kann ein erfindungsgemäßes Fusionsmolekül oder eine dafür kodierende  
10 Nukleinsäure an ein Lebewesen in einer Anordnung oder Kombination mit der Verabreichung einer Vakzine-Zusammensetzung verabreicht werden, um die gewünschte Wirkung einer derartigen Vakzine-Zusammensetzung zu verstärken oder zu verlängern.

15 Eine Nukleinsäure ist erfindungsgemäß vorzugsweise Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Ribonukleinsäure (RNA). Nukleinsäuren umfassen erfindungsgemäß genomische DNA, cDNA, mRNA, rekombinant hergestellte und chemisch synthetisierte Moleküle. Eine Nukleinsäure kann erfindungsgemäß als einzelsträngiges oder doppelsträngiges und lineares  
20 oder kovalent kreisförmig geschlossenes Molekül vorliegen.

25 Eine von einer Nukleinsäuresequenz abgeleitete Sequenz oder der Begriff „von einer Nukleinsäuresequenz abgeleitete Sequenz“ betrifft erfindungsgemäß homologe Sequenzen und Derivate der ersten Sequenz.

Homologe Nukleinsäuresequenzen weisen erfindungsgemäß mindestens 40%, insbesondere mindestens 50%, mindestens 60%, mindestens 70%, mindestens 80%, mindestens 90% und vorzugsweise mindestens 95%, mindestens 98 oder mindestens 99% Identität der Nukleotide auf.

30 Eine Nukleinsäure ist insbesondere dann zu einer anderen Nukleinsäure „homolog“, wenn die beiden Sequenzen der komplementären Stränge

miteinander hybridisieren und ein stabiles Duplex eingehen können, wobei die Hybridisierung vorzugsweise unter Bedingungen erfolgt, die eine spezifische Hybridisierung zwischen Polynukleotiden erlauben (stringente Bedingungen). Stringente Bedingungen sind beispielsweise in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook et al., Hrsg., 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 oder Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., Hrsg., John Wiley & Sons, Inc., New York, beschrieben und betreffen beispielsweise die Hybridisierung bei 65°C in Hybridisierungspuffer (3,5 x SSC, 0,02% Ficoll, 0,02% Polyvinylpyrrolidon, 0,02% Rinderserumalbumin, 2,5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7), 0,5% SDS, 2mM EDTA). SSC ist 0,15 M Natriumchlorid / 0,15 M Natriumcitrat, pH 7. Nach der Hybridisierung wird die Membran, auf die die DNA übertragen wurde beispielsweise in 2 x SSC bei Raumtemperatur und sodann in 0,1 - 0,5 x SSC / 0,1 x SDS bei Temperaturen bis 68°C gewaschen.

Mit „Derivat“ einer Nukleinsäure ist erfindungsgemäß gemeint, dass einzelne oder multiple Nukleotidsubstitutionen, -deletionen und/oder -additionen in der Nukleinsäure vorliegen. Weiterhin umfasst der Begriff „Derivat“ auch eine chemische Derivatisierung einer Nukleinsäure an einer Base, einem Zucker oder Phosphat eines Nukleotids. Der Begriff „Derivat“ umfasst auch Nukleinsäuren, die nicht in der Natur vorkommende Nukleotide und Nukleotidanaloga enthalten.

Die erfindungsgemäß beschriebenen Nukleinsäuren sind vorzugsweise isoliert. Der Begriff „isolierte Nukleinsäure“ bedeutet erfindungsgemäß, dass die Nukleinsäure (i) in vitro amplifiziert wurde, zum Beispiel durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR), (ii) rekombinant durch Klonierung produziert wurde, (iii) gereinigt wurde, zum Beispiel durch Spaltung und gelelektrophoretische Auftrennung, oder (iv) synthetisiert wurde, zum Beispiel durch chemische Synthese. Eine isolierte Nukleinsäure ist eine Nukleinsäure, die für eine Manipulierung durch rekombinante DNA-Techniken zur Verfügung steht.

Nukleinsäuren, die für Fusionsmoleküle kodieren, können erfindungsgemäß alleine oder in Kombination mit anderen Nukleinsäuren, insbesondere heterologen Nukleinsäuren, vorliegen. In bevorzugten Ausführungsformen liegt eine Nukleinsäure funktionell in Verbindung mit Expressionskontrollsequenzen oder regulatorischen Sequenzen vor, die in Bezug zu der Nukleinsäure homolog oder heterolog sein können. Eine kodierende Sequenz und eine regulatorische Sequenz sind dann „funktionell“ miteinander verbunden, falls sie derart kovalent miteinander verknüpft sind, dass die Expression oder Transkription der kodierenden Sequenz unter der Kontrolle oder unter dem Einfluss der regulatorischen Sequenz steht. Falls die kodierende Sequenz in ein funktionelles Protein translatiert werden soll, führt bei einer funktionellen Verbindung einer regulatorischen Sequenz mit der kodierenden Sequenz eine Induktion der regulatorischen Sequenz zu einer Transkription der kodierenden Sequenz, ohne dass es zu einer Leserasterverschiebung in der kodierenden Sequenz oder zu einem Unvermögen der kodierenden Sequenz kommt, in das gewünschte Protein oder Peptid translatiert zu werden.

Der Begriff „Expressionskontrollsequenz“ oder „regulatorische Sequenz“ umfasst erfindungsgemäß Promotoren, Enhancer und andere Kontrollelemente, die die Expression eines Gens steuern. In bestimmten erfindungsgemäßen Ausführungsformen sind die Expressionskontrollsequenzen regulierbar. Die genaue Struktur von regulatorischen Sequenzen kann speziesabhängig oder zelltypusabhängig variieren, umfasst jedoch im Allgemeinen 5'-nicht-transkribierte und 5'-nicht-translatierte Sequenzen, die an der Initiation der Transkription bzw. Translation beteiligt sind wie TATA-Box, Capping-Sequenz, CAAT-Sequenz und ähnliches. Insbesondere umfassen 5'-nicht-transkribierte Regulationssequenzen eine Promotorregion, die eine Promotorsequenz für eine transkriptionelle Kontrolle des funktionell verbundenen Gens

einschließt. Regulatorische Sequenzen können auch Enhancer-Sequenzen oder stromaufwärts gelegene Aktivatorsequenzen umfassen.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Nukleinsäure  
 5 erfindungsgemäß ein Vektor, gegebenenfalls mit einem Promotor, der die Expression einer Nukleinsäure, z.B. einer Nukleinsäure, die für ein erfindungsgemäßes Fusionsmolekül kodiert, steuert. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Promoter ein T7-, T3- oder SP6-Promoter.

10 Der Begriff „Vektor“ wird dabei in seiner allgemeinsten Bedeutung verwendet und umfasst jegliche intermediären Vehikel für eine Nukleinsäure, die es z.B. ermöglichen, die Nukleinsäure in prokaryontische und/oder in eukaryontische Zellen einzubringen und gegebenenfalls in ein Genom zu integrieren. Solche Vektoren werden vorzugsweise in der Zelle repliziert  
 15 und/oder exprimiert. Ein intermediäres Vehikel kann z.B. für den Gebrauch bei der Elektroporation, beim Mikroprojektilbeschuss, bei der liposomalen Verabreichung, beim Transfer mit Hilfe von Agrobakterien oder bei der Insertion über DNA- oder RNA-Viren angepasst sein. Vektoren umfassen Plasmide, Phagemide, Bacteriophage oder Virusgenome.

20 Die Nukleinsäuren, die für ein erfindungsgemäßes Fusionsmolekül kodieren, können für eine Transfektion von Wirtszellen eingesetzt werden. Mit Nukleinsäuren ist dabei sowohl rekombinante DNA wie auch RNA gemeint. Rekombinante RNA kann durch in vitro-Transkription von einer DNA-  
 25 Matritze hergestellt werden. Sie kann des weiteren vor Applikation durch stabilisierende Sequenzen, Capping und Poly-Adenylierung modifiziert werden.

30 Der Begriff „Wirtszelle“ betrifft erfindungsgemäß jede Zelle, die mit einer exogenen Nukleinsäure transformierbar oder transfizierbar ist. Der Begriff „Wirtszellen“ umfasst erfindungsgemäß prokaryontische (z.B. E. coli) oder eukaryontische (z.B. dendritische Zellen, B-Zellen, CHO-Zellen, COS-Zellen,

K562-Zellen, Hefezellen und Insektenzellen). Besonders bevorzugt sind Säugerzellen wie Zellen aus Mensch, Maus, Hamster, Schwein, Ziege und Primaten. Die Zellen können aus einer Vielzahl von Gewebetypen abgeleitet sein und umfassen primäre Zellen und Zelllinien. Spezifische Beispiele  
5 umfassen Keratinozyten, periphere Blutleukozyten, Stammzellen des Knochenmarks und embryonale Stammzellen. In weiteren Ausführungsformen ist die Wirtszelle eine Antigen-präsentierende Zelle, insbesondere eine dendritische Zelle, ein Monozyt oder Makrophage. Eine Nukleinsäure kann in der Wirtszelle in einer einzigen oder in mehreren  
10 Kopien vorliegen und wird in einer Ausführungsform in der Wirtszelle exprimiert.

Der Begriff „Expression“ wird erfindungsgemäß in seiner allgemeinsten Bedeutung verwendet und umfasst die Produktion von RNA oder von RNA  
15 und Protein. Er umfasst auch eine teilweise Expression von Nukleinsäuren. Des weiteren kann die Expression transient oder stabil erfolgen. Bevorzugte Expressionssysteme in Säugerzellen umfassen pcDNA3.1 und pRc/CMV (Invitrogen, Carlsbad, CA), die einen selektierbaren Marker enthalten wie ein Gen, das eine Resistenz gegenüber G418 verleiht (und somit eine Selektion  
20 stabil transfizierter Zelllinien ermöglicht), und die Enhancer-Promotor-Sequenzen von Cytomegalovirus (CMV).

Eine für ein erfindungsgemäßes Fusionsmolekül kodierende Nukleinsäure kann auch eine Nukleinsäuresequenz umfassen, die für ein MHC-Molekül,  
25 vorzugsweise für ein HLA-Molekül kodiert. Die Nukleinsäuresequenz, die für ein MHC-Molekül kodiert, kann auf demselben Expressionsvektor wie die Nukleinsäure, die für das Fusionsmolekül kodiert, vorliegen oder beide Nukleinsäuren können auf verschiedenen Expressionsvektoren vorliegen. Im letzteren Fall können die beiden Expressionsvektoren in eine Zelle  
30 cotransfiziert werden.

Eine von einer Aminosäuresequenz abgeleitete Sequenz oder der Begriff „von einer Aminosäuresequenz abgeleitete Sequenz“ betrifft erfindungsgemäß homologe Sequenzen und Derivate der ersteren Sequenz.

- 5 Homologe Aminosäuresequenzen weisen erfindungsgemäß mindestens 40%, insbesondere mindestens 50%, mindestens 60%, mindestens 70%, mindestens 80%, mindestens 90% und vorzugsweise mindestens 95%, mindestens 98 oder mindestens 99% Identität der Aminosäurereste auf.
- 10 „Derivate“ eines Proteins oder Polypeptids oder einer Aminosäuresequenz im Sinne dieser Erfindung umfassen Aminosäure-Insertionsvarianten, Aminosäure-Deletionsvarianten und/oder Aminosäure-Substitutionsvarianten.
- 15 Aminosäure-Insertionsvarianten umfassen amino- und/oder carboxyterminale Fusionen, sowie Insertionen von einzelnen oder mehreren Aminosäuren in einer bestimmten Aminosäuresequenz. Bei Aminosäure-Sequenzvarianten mit einer Insertion werden ein oder mehrere Aminosäurereste in eine vorbestimmte Stelle in einer Aminosäuresequenz  
20 eingebracht, obwohl eine zufällige Insertion mit geeignetem Screening des resultierenden Produkts auch möglich ist. Aminosäure-Deletionsvarianten sind durch das Entfernen von einer oder mehreren Aminosäuren aus der Sequenz charakterisiert. Aminosäure-Substitutionsvarianten zeichnen sich dadurch aus, dass wenigstens ein Rest in der Sequenz entfernt und ein  
25 anderer Rest an dessen Stelle eingefügt wird. Vorzugsweise befinden sich die Modifikationen an Positionen in der Aminosäuresequenz, die zwischen homologen Proteinen oder Polypeptiden nicht konserviert sind. Vorzugsweise werden Aminosäuren durch andere mit ähnlichen Eigenschaften, wie Hydrophobizität, Hydrophilizität, Elektronegativität, Volumen der Seitenkette  
30 und ähnliches, ersetzt (konservative Substitution). Konservative Substitutionen betreffen beispielsweise den Austausch einer Aminosäure

durch eine andere, wobei beide Aminosäuren in derselben nachstehenden Gruppe aufgeführt sind:

1. kleine aliphatische, nicht-polare oder leicht-polare Reste: Ala, Ser, Thr  
5 (Pro, Gly)
2. negativ geladene Reste und ihre Amide: Asn, Asp, Glu, Gln
3. positiv geladene Reste: His, Arg, Lys
4. große aliphatische, nicht-polare Reste: Met, Leu, Ile, Val (Cys)
5. große aromatische Reste: Phe, Tyr, Trp.

10

Drei Reste sind aufgrund ihrer besonderen Rolle für die Proteinarchitektur in Klammern gesetzt. Gly ist der einzige Rest ohne eine Seitenkette und verleiht der Kette somit Flexibilität. Pro besitzt eine ungewöhnliche Geometrie, die die Kette stark einschränkt. Cys kann eine Disulfidbrücke bilden.

15

Die vorstehend beschriebenen Aminosäure-Varianten können leicht mit Hilfe von bekannten Peptidsynthesetechniken wie z.B. durch „Solid Phase Synthesis“ (Merrifield, 1964) und ähnliche Verfahren oder durch rekombinante DNA-Manipulation hergestellt werden. Techniken, um  
20 Substitutionsmutationen an vorbestimmten Stellen in DNA einzubringen, die eine bekannte oder teilweise bekannte Sequenz besitzt, sind gut bekannt und umfassen z.B. M13-Mutagenese. Die Manipulation von DNA-Sequenzen zur Herstellung von Proteinen mit Substitutionen, Insertionen oder Deletionen und die allgemeinen rekombinanten Verfahren zur Expression  
25 von Proteinen z.B. in einem biologischen System (wie Säuger-, Insekten-, Pflanzen- und viralen Systeme) sind z.B. in Sambrook et. al. (1989) ausführlich beschrieben.

„Derivate“ von Proteinen oder Polypeptiden umfassen erfindungsgemäß auch  
30 einzelne oder multiple Substitutionen, Deletionen und/oder Additionen jeglicher Moleküle, die mit dem Enzym assoziiert sind, wie Kohlenhydrate, Lipide und/oder Proteine oder Polypeptide.

In einer Ausführungsform umfassen „Derivate“ von Proteinen oder Polypeptiden diejenigen modifizierten Analoga, die durch Glykosylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, Amidierung, Palmitoylierung, Myristoylierung, Isoprenylierung, Lipidierung, Alkylierung, Derivatisierung, Einbringen von Schutz-/Blockierungsgruppen, proteolytische Spaltung oder Bindung an einen Antikörper oder an einen anderen zellulären Liganden entstehen. Derivate von Proteinen oder Polypeptiden können auch durch andere Verfahren wie beispielsweise durch chemische Spaltung mit Bromcyan, Trypsin, Chymotrypsin, Papain, V8-Protease,  $\text{NaBH}_2$ , Acetylierung, Formylierung, Oxidation, Reduktion oder durch metabolische Synthese in Gegenwart von Tunicamycin hergestellt werden.

Ferner erstreckt sich der Begriff „Derivat“ auch auf alle funktionellen chemischen Äquivalente der Proteine oder Polypeptide.

Die erfindungsgemäß beschriebenen pharmazeutischen Zusammensetzungen können therapeutisch für die Behandlung einer bereits bestehenden Erkrankung oder prophylaktisch als Vakzinen für die Immunisierung eingesetzt werden.

Der Begriff „Vakzine“ betrifft erfindungsgemäß eine antigenische Zubereitung, die beispielsweise ein Protein, ein Peptid, eine Nukleinsäure oder ein Polysaccharid umfasst und die an einen Empfänger verabreicht wird, um dessen humorales und/oder zelluläres Immunsystem gegenüber einem oder mehreren Antigenen zu stimulieren, die in der Vakzinezubereitung vorliegen. Die Begriffe „Vakzinierung“ oder „Immunisierung“ betreffen den Vorgang einer Verabreichung einer Vakzine und der Stimulierung einer Immunreaktion gegenüber einem Antigen. Der Begriff „Immunreaktion“ betrifft die Aktivitäten des Immunsystems, einschließlich Aktivierung und Proliferation von spezifischen cytotoxischen T-Zellen nach Kontakt mit einem Antigen.



Tiermodelle können für ein Testen einer immunisierenden Wirkung z.B. gegenüber Krebs bei Verwendung eines Tumor-assoziierten Antigens als Antigen eingesetzt werden. Dabei können beispielsweise menschliche Krebszellen in eine Maus für die Schaffung eines Tumors eingebracht werden und eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, die für ein erfindungsgemäßes Fusionsmolekül, umfassend das Tumor-assoziiertes Antigen, kodiert, kann verabreicht werden. Die Wirkung auf die Krebszellen (beispielsweise Verringerung der Tumorgroße) kann als Maß für die Wirksamkeit einer Immunisierung durch die Nukleinsäure gemessen werden.

Als Teil der Zusammensetzung für eine Immunisierung werden ein oder mehrere Fusionsmoleküle mit einem oder mehreren Adjuvantien für eine Induktion einer Immunreaktion oder eine Erhöhung einer Immunreaktion verabreicht. Ein Adjuvans ist eine Substanz, die in ein Antigen eingebaut oder gemeinsam mit diesem verabreicht wird und die Immunreaktion verstärkt. Adjuvantien können die Immunreaktion durch Bereitstellen eines Antigen-Reservoirs (extrazellulär oder in Makrophagen), Aktivierung von Makrophagen und Stimulierung bestimmter Lymphozyten verstärken. Adjuvantien sind bekannt und umfassen in nicht begrenzender Weise Monophosphoryl-Lipid-A (MPL, SmithKline Beecham), Saponine wie QS21 (SmithKline Beecham), DQS21 (SmithKline Beecham; WO 96/33739), QS7, QS17, QS18 und QS-L1 (So et al., Mol. Cells 7:178-186, 1997), unvollständiges Freundsches Adjuvans, vollständiges Freundsches Adjuvans, Vitamin E, Montanid, Alaun, CpG-Oligonukleotide (vgl. Krieg et al., Nature 374:546-9, 1995) und verschiedene Wasser-in-Öl-Emulsionen, die aus biologisch abbaubaren Ölen wie Squalen und/oder Tocopherol hergestellt werden. Vorzugsweise werden die Fusionsmoleküle in einem Gemisch mit DQS21/MPL verabreicht. Das Verhältnis von DQS21 zu MPL beträgt typischerweise etwa 1:10 bis 10:1, vorzugsweise etwa 1:5 bis 5:1 und insbesondere etwa 1:1. Für eine Verabreichung an den Menschen sind

DQS21 und MPL typischerweise in einer Vakzine-Formulierung in einem Bereich von etwa 1 µg bis etwa 100 µg vorhanden.

Andere Stoffe, die eine Immunreaktion des Patienten stimulieren, können auch verabreicht werden. Zum Beispiel sind Zytokine bei einer Vakzinierung aufgrund ihrer regulatorischen Eigenschaften auf Lymphozyten verwendbar. Solche Zytokine umfassen z.B. Interleukin-12 (IL-12), von dem gezeigt wurde, dass es die schützenden Wirkungen von Vakzinen verstärkt (vgl. Science 268:1432-1434, 1995), GM-CSF und IL-18.

10

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Induktion einer Immunreaktion in einem Säuger umfasst im Allgemeinen die Verabreichung einer wirksamen Menge eines erfindungsgemäßen Fusionsmoleküls und/oder einer dafür kodierenden Nukleinsäure, insbesondere in Form eines Vektors. Vorzugsweise wird DNA oder RNA, die für ein erfindungsgemäßes Fusionsmolekül kodiert, an einen Säuger zusammen mit einer DNA-Sequenz verabreicht, die für einen T-Zell-co-stimulierenden Faktor kodiert, wie ein für B7-1 oder B7-2 kodierendes Gen.

Der Begriff „T-Zell-co-stimulierender Faktor“ betrifft hier ein Molekül, insbesondere ein Peptid, das zur Bereitstellung eines co-stimulierenden Signals fähig ist und dadurch eine Immunreaktion verstärkt, insbesondere die Vermehrung von T-Zellen in Gegenwart eines oder mehrerer erfindungsgemäßer Fusionsmoleküle aktiviert. Eine derartige Aktivierung der T-Zell-Vermehrung kann durch allgemein bekannte Tests bestimmt werden.

Diese Faktoren umfassen co-stimulierende Moleküle, die in Form von Proteinen oder Nukleinsäuren bereitgestellt werden. Solche co-stimulierenden Moleküle sind beispielsweise B7-1 und B7-2 (CD80 bzw. CD86), die auf dendritischen Zellen (DC) exprimiert werden und mit dem auf den T-Zellen exprimierten CD28-Molekül interagieren. Diese Interaktion stellt eine Co-Stimulierung (Signal 2) für eine Antigen/MHC/TCR-stimulierte

(Signal 1) T-Zelle bereit, wodurch die Vermehrung der T-Zelle und die Effektorfunktion verstärkt wird. B7 interagiert auch mit CTLA4 (CD152) auf T-Zellen und Untersuchungen, die CTLA4- und B7-Liganden einbeziehen, zeigen, dass die B7-CTLA4-Interaktion eine Antitumor-Immunität und CTL-  
5 Vermehrung verstärken kann (Zheng, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(11):6284-6289 (1998)).

B7 wird typischerweise nicht auf Tumorzellen exprimiert, so dass diese keine wirksamen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) für T-Zellen sind. Eine  
10 Induktion der B7-Expression würde ermöglichen, dass Tumorzellen wirksamer eine Vermehrung von cytotoxischen T-Lymphozyten und eine Effektorfunktion stimulieren. Eine Co-Stimulierung durch eine Kombination von B7/IL-6/IL-12 zeigte eine Induktion des IFN-gamma- und Th1-Zytokin-  
Profils in einer T-Zell-Population, was zu einer weiter verstärkten T-Zell-  
15 Aktivität führt (Gajewski et al., J. Immunol. 154:5637-5648 (1995)).

Eine vollständige Aktivierung von cytotoxischen T-Lymphozyten und eine vollständige Effektorfunktion erfordert eine Mitwirkung von T-Helferzellen durch die Interaktion zwischen dem CD40-Liganden auf den T-Helferzellen  
20 und dem CD40-Molekül, das von dendritischen Zellen exprimiert wird (Ridge et al., Nature 393:474 (1998), Bennett et al., Nature 393:478 (1998), Schönberger et al., Nature 393:480 (1998)). Der Mechanismus dieses co-  
stimulierenden Signals betrifft wahrscheinlich die Steigerung der B7- und assoziierten IL-6/IL-12-Produktion durch die dendritischen Zellen (Antigen-  
25 präsentierenden Zellen). Die CD40-CD40L-Interaktion komplementiert so die Interaktionen des Signals 1 (Antigen/MHC-TCR) und des Signals 2 (B7-CD28).

Erfindungsgemäß vorgesehen ist eine Verabreichung von Nukleinsäuren,  
30 Polypeptiden oder Proteinen. Eine Verabreichung von DNA und RNA ist bevorzugt.

In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu dem nicht-modifizierten Antigen erfindungsgemäß eine 100-fach geringere Dosis des Impfstoffs ausreicht, um äquivalente oder stärkere Immunantworten zu induzieren. Ein Problem bei der direkten Injektion von Nukleinsäure-  
 5 Impfstoffen ist, dass die Dosis, die nötig ist, um Immunantworten zu induzieren, sehr hoch ist. Bei DNA-Impfstoffen ist die Ursache vermutlich hauptsächlich darin begründet, dass nur ein Bruchteil der Zellen injizierte DNA in den Kern aufnehmen. Bei RNA-Impfstoffen liegt das Problem vermutlich insbesondere darin, dass injizierte RNA sehr schnell durch  
 10 RNAsen abgebaut wird.

Bei Verwendung der erfindungsgemäß modifizierten Impfstoffe ist zu erwarten, dass bei einer direkten Injektion von Nukleinsäuren, insbesondere RNA im Vergleich zu unmodifizierten Nukleinsäuren massiv höhere  
 15 Immunantworten erhalten werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist ein viraler Vektor für die Verabreichung einer Nukleinsäure, die für ein erfindungsgemäßes Fusionsmolekül kodiert, aus der Gruppe ausgewählt bestehend aus  
 20 Adenoviren, Adeno-assoziierten Viren, Poxviren, einschließlich Vacciniavirus und attenuierten Poxviren, Semliki-Forest-Virus, Retroviren, Sindbis-Virus und Ty-Virus-ähnlichen Partikeln. Besonders bevorzugt sind Adenoviren und Retroviren. Die Retroviren sind üblicherweise replikationsdefizient (d.h. sie sind unfähig, infektiöse Partikel zu erzeugen).

25

Verschiedene Verfahren können eingesetzt werden, um erfindungsgemäß Nukleinsäuren in Zellen in vitro oder in vivo einzubringen. Solche Verfahren umfassen die Transfektion von Nukleinsäure-Kalziumphosphat-Präzipitaten, die Transfektion von Nukleinsäuren, die mit DEAE assoziiert sind, die  
 30 Transfektion oder Infektion mit den vorstehenden Viren, die die interessierenden Nukleinsäuren tragen, die Liposomen-vermittelte Transfektion und ähnliches. In bestimmten Ausführungsformen ist eine

Steuerung der Nukleinsäure an bestimmte Zellen bevorzugt. In solchen Ausführungsformen kann ein Träger, der für die Verabreichung einer Nukleinsäure an eine Zelle (z.B. ein Retrovirus oder ein Liposom) eingesetzt wird, ein gebundenes Zielsteuerungsmolekül aufweisen. Zum Beispiel kann  
5 ein Molekül wie ein Antikörper, der für ein Oberflächenmembran-Protein auf der Zielzelle spezifisch ist, oder ein Ligand für einen Rezeptor auf der Zielzelle in den Nukleinsäureträger eingebaut oder daran gebunden werden. Falls eine Verabreichung einer Nukleinsäure durch Liposomen erwünscht ist, können Proteine, die an ein Oberflächenmembran-Protein binden, das  
10 mit der Endozytose assoziiert ist, in die Liposomenformulierung eingebaut werden, um eine Zielsteuerung und/oder Aufnahme zu ermöglichen. Solche Proteine umfassen Kapsid-Proteine oder Fragmente davon, die für einen bestimmten Zelltyp spezifisch sind, Antikörper gegen Proteine, die internalisiert werden, Proteine, die eine intrazelluläre Stelle ansteuern, und  
15 ähnliches.

Vorzugsweise werden die Nukleinsäuren zusammen mit stabilisierenden Substanzen wie RNA-stabilisierenden Substanzen verabreicht.

20 Eine Verabreichung von Polypeptiden und Peptiden kann in an sich bekannter Weise erfolgen. In einer Ausführungsform erfolgt die Verabreichung von Nukleinsäuren durch ex vivo-Verfahren, d.h. durch Entfernung von Zellen aus einem Patienten, genetische Veränderung der Zellen, und Wiedereinbringung der veränderten Zellen in den Patienten. Dies  
25 umfasst im Allgemeinen das Einbringen einer funktionellen Kopie eines Gens in die Zellen eines Patienten in vitro und die Rückführung der genetisch veränderten Zellen in den Patienten. Die funktionelle Kopie des Gens steht unter funktioneller Kontrolle von regulatorischen Elementen, die eine Expression des Gens in den genetisch veränderten Zellen erlauben.  
30 Transfektions- und Transduktionsverfahren sind dem Fachmann bekannt. Erfindungsgemäß vorgesehen ist auch eine Verabreichung von

Nukleinsäuren in vivo durch die Verwendung von Vektoren wie Viren und zielgesteuerten Liposomen.

Der Begriff „Patient“ oder „Individuum“ bedeutet erfindungsgemäß Mensch, nicht menschlicher Primat oder ein anderes Tier, insbesondere Säugetier wie Kuh, Pferd, Schwein, Schaf, Ziege, Hund, Katze, Vögel wie Huhn oder Nagetier wie Maus und Ratte. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Patient oder das Individuum ein Mensch.

Die erfindungsgemäßen therapeutischen Zusammensetzungen können in pharmazeutisch verträglichen Zubereitungen verabreicht werden. Solche Zubereitungen können gewöhnlich pharmazeutisch verträgliche Konzentrationen von Salzen, Pufferstoffen, Konservierungstoffen, Trägern, ergänzenden immunitätssteigernden Stoffen wie Adjuvanzen (z.B. CpG-Oligonukleotide) und Zytokine und gegebenenfalls andere therapeutische Wirkstoffe enthalten.

Die erfindungsgemäßen therapeutischen Wirkstoffe können auf jedem herkömmlichen Weg verabreicht werden, einschließlich durch Injektion oder durch Infusion. Die Verabreichung kann beispielsweise oral, intravenös, intraperitoneal, intramuskulär, subkutan, intrakutan, transdermal, intralymphatisch, vorzugsweise durch Injektion in Lymphknoten, insbesondere Leistenlymphknoten, Lymphgefäße und/oder in die Milz, erfolgen.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen werden in wirksamen Mengen verabreicht. Eine „wirksame Menge“ betrifft die Menge, die alleine oder zusammen mit weiteren Dosen eine gewünschte Reaktion oder eine gewünschte Wirkung erzielt. Im Fall einer Behandlung einer bestimmten Erkrankung oder eines bestimmten Zustands betrifft die gewünschte Reaktion die Hemmung des Krankheitsverlaufs. Dies umfasst die Verlangsamung des Fortschreitens der Erkrankung und insbesondere eine

Unterbrechung des Fortschreitens der Erkrankung. Die gewünschte Reaktion bei einer Behandlung einer Erkrankung oder eines Zustands kann auch die Verzögerung des Ausbruchs oder eine Verhinderung des Ausbruchs der Erkrankung oder des Zustands sein.

5

Eine wirksame Menge einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung wird von dem zu behandelnden Zustand, der Schwere der Krankheit, den individuellen Parametern des Patienten, einschließlich Alter, physiologischer Zustand, Größe und Gewicht, der Dauer der Behandlung, der Art einer  
10 begleitenden Therapie (falls vorhanden), dem spezifischen Verabreichungsweg und ähnlichen Faktoren abhängen.

15

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen sind vorzugsweise steril und enthalten eine wirksame Menge der therapeutisch  
wirksamen Substanz für die Erzeugung der gewünschten Reaktion oder der  
gewünschten Wirkung.

20

Die Dosen der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen, die verabreicht werden, können von verschiedenen Parametern wie der Verabreichungsart, dem Zustand des Patienten, dem gewünschten Verabreichungszeitraum, usw. abhängen. Für den Fall, dass eine Reaktion bei einem Patienten bei  
einer anfänglichen Dosis unzureichend ist, können höhere Dosen (oder  
effektiv höhere Dosen, die durch einen anderen, stärker lokalisierten  
Verabreichungsweg erzielt werden) eingesetzt werden.

25

30

Im Allgemeinen werden für eine Behandlung oder für eine Erzeugung oder Erhöhung einer Immunreaktion Dosen des Tumor-assoziierten Antigens von 1 ng bis 1 mg, vorzugsweise von 10 ng bis 100 µg formuliert und verabreicht. Falls die Verabreichung von Nukleinsäuren (DNA sowie RNA) erwünscht ist,  
werden Dosen von 1 ng bis 0,1 mg formuliert und verabreicht.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen werden im Allgemeinen in pharmazeutisch verträglichen Mengen und in pharmazeutisch verträglichen Zusammensetzungen verabreicht. Der Begriff „pharmazeutisch verträglich“ betrifft ein nicht-toxisches Material, das nicht mit der Wirkung des aktiven Bestandteils der pharmazeutischen Zusammensetzung wechselwirkt. Solche Zubereitungen können gewöhnlich Salze, Pufferstoffe, Konservierungsstoffe, Träger und gegebenenfalls andere therapeutische Wirkstoffe enthalten. Bei einer Verwendung in der Medizin sollten die Salze pharmazeutisch verträglich sein. Nicht-pharmazeutisch verträgliche Salze können jedoch für die Herstellung pharmazeutisch verträglicher Salze davon verwendet werden und sind erfindungsgemäß umfasst. Solche pharmakologisch und pharmazeutisch verträglichen Salze umfassen in nicht begrenzender Weise diejenigen, die aus den nachstehenden Säuren hergestellt werden: Chlorwasserstoff-, Bromwasserstoff-, Schwefel-, Salpeter-, Phosphor-, Malein-, Essig-, Salicyl-, Citronen-, Ameisen-, Malon-, Bernsteinsäure und ähnliches. Pharmazeutisch verträgliche Salze können auch als Alkalimetall- oder Erdalkalimetallsalze wie Natrium-, Kalium- oder Calciumsalze hergestellt werden.

Eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung kann einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfassen. Der Begriff „pharmazeutisch verträglicher Träger“ betrifft erfindungsgemäß einen oder mehrere kompatible feste oder flüssige Füllstoffe, Verdünnungsmittel oder Kapselsubstanzen, die für eine Verabreichung an einen Menschen geeignet sind. Der Begriff „Träger“ betrifft einen organischen oder anorganischen Bestandteil, natürlicher oder synthetischer Natur, in dem der aktive Bestandteil kombiniert wird, um eine Anwendung zu erleichtern. Die Bestandteile der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung sind gewöhnlich derart, dass keine Interaktion auftritt, die die gewünschte pharmazeutische Wirksamkeit wesentlich beeinträchtigt.



Vorzugsweise sind die Trägerstoffe sterile Flüssigkeiten wie Wasser oder Öle, einschließlich derjenigen, die sich von Erdöl, Tieren oder Pflanzen ableiten oder synthetischen Ursprungs sind, wie z.B. Erdnussöl, Sojabohnenöl, Mineralöl, Sesamöl, Sonnenblumenöl und dergleichen. Salzlösungen und  
 5 wässrige Dextrose- und Glycerinlösungen können auch als wässrige Trägerstoffe verwendet werden.

Beispiele für Hilfs- und Trägerstoffe sind Acryl- und Methacrylderivate, Alginsäure, Sorbinsäurederivate wie  $\alpha$ -Octadecyl- $\omega$ -hydroxypoly(oxyethylen)-  
 10 5-sorbinsäure, Aminosäuren und deren Derivate, insbesondere Aminverbindungen wie Cholin, Lecithin und Phosphatidylcholin, Gummi arabicum, Aromastoffe, Ascorbinsäure, Carbonate wie beispielsweise Natrium-, Kalium-, Magnesium- und Calciumcarbonat und -hydrogencarbonat, Hydrogenphosphate und Phosphate von Natrium,  
 15 Kalium, Calcium und Magnesium, Carmellose, Dimeticon, Farbstoffe, Geschmacksstoffe, Puffersubstanzen, Konservierungsmittel, Verdickungsmittel, Weichmacher, Gelatine, Glucosesirupe, Malz, hochdisperses Siliziumdioxid, Hydromellose, Benzoate, insbesondere Natrium- und Kaliumbenzoat, Macrogol, Magermilchpulver, Magnesiumoxid,  
 20 Fettsäuren und deren Derivate und Salze wie Stearinsäure und Stearate, insbesondere Magnesium- und Calciumstearat, Fettsäureester sowie Mono- und Diglyceride von Speisefettsäuren, natürliche und künstliche Wachse wie Bienenwachs, gelbes Wachs und Montanglycolwachs, Chloride, insbesondere Natriumchlorid, Polyvidon, Polyethylenglykole, Polyvinylpyrrolidon, Povidon,  
 25 Öle wie Rizinusöl, Sojaöl, Kokosnussöl, Palmkernöl, Zucker und Zuckerderivate, insbesondere Mono- und Disaccharide wie Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Lactose, Maltose, Xylose, Saccharose, Dextrose und Cellulose und deren Derivate, Schellack, Stärke und Stärkederivate, insbesondere Maisstärke, Talg, Talkum, Titandioxid,  
 30 Weinsäure, Zuckeralkohole wie Glycerin, Mannit, Sorbit und Xylit und deren Derivate, Glykol, Ethanol und Gemische derselben.

Vorzugsweise können die pharmazeutischen Zusammensetzungen zusätzlich auch Benetzungsmittel, Emulgatoren und/oder pH-puffernde Mittel enthalten.

- 5 In einer weiteren Ausführungsform können die pharmazeutischen Zusammensetzungen einen Resorptionsverstärker enthalten. Diese Resorptionsverstärker können, falls gewünscht, eine äquimolare Menge des Trägerstoffs in der Zusammensetzung ersetzen. Beispiele für solche Resorptionsverstärker umfassen in nicht begrenzender Weise Eucalyptol,
- 10 N,N-Diethyl-m-toluamid, Polyoxyalkylenalkohole (wie Propylenglykol und Polyethylenglykol), N-Methyl-2-pyrrolidon, Isopropylmyristat, Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylacetamid (DMA), Harnstoff, Diethanolamin, Triethanolamin und dergleichen (siehe z.B. Percutaneous Penetration Enhancers, Hrsg. Smith et al. (CRC Press, 1995)).
- 15 Die Menge an Resorptionsverstärker in der Zusammensetzung kann von den gewünschten zu erreichenden Wirkungen abhängen.

Ein Protease-Inhibitor kann in die erfindungsgemäße Zusammensetzung eingebaut werden, um einen Abbau eines Peptid- oder Proteinwirkstoffs zu vermeiden und dadurch die Bioverfügbarkeit zu erhöhen. Beispiele für

20 Protease-Inhibitoren umfassen in nicht-begrenzender Weise Aprotinin, Leupepsin, Pepstatin,  $\alpha$ 2-Makroglobulin und Trypsin-Inhibitor. Diese Inhibitoren können alleine oder in Kombination verwendet werden.

- 25 Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen können mit einer oder mehreren Beschichtungen versehen sein. Vorzugsweise sind die festen oralen Darreichungsformen mit einer magensaftresistenten Beschichtung versehen oder liegen in Form einer magensaftresistenten, gehärteten Weichgelatine kapsel vor.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen können geeignete Pufferstoffe wie Essigsäure in einem Salz, Citronensäure in einem Salz, Borsäure in einem Salz und Phosphorsäure in einem Salz enthalten.

- 5 Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können auch gegebenenfalls geeignete Konservierungsstoffe wie Benzalkoniumchlorid, Chlorbutanol, Parabene und Thimerosal enthalten.

10 Die pharmazeutischen Zusammensetzungen werden gewöhnlich in einer einheitlichen Dosisform dargeboten und können in an sich bekannter Weise hergestellt werden. Erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzungen können beispielsweise in Form von Kapseln, Tabletten, Lutschpastillen, Lösungen, Suspensionen, Sirupen, Elixieren oder als Emulsion vorliegen.

15

Zusammensetzungen, die für eine parenterale Verabreichung geeignet sind, umfassen gewöhnlich eine sterile wässrige oder nicht-wässrige Zubereitung des Wirkstoffs, die vorzugsweise mit dem Blut des Empfängers isotonisch ist. Verträgliche Träger und Lösungsmittel sind beispielsweise Ringer-Lösung  
20 und isotonische Natriumchloridlösung. Zusätzlich werden gewöhnlich sterile, fixierte Öle als Lösungs- oder Suspensionsmedium eingesetzt.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele und Figuren ausführlich beschrieben, die ausschließlich der Erläuterung dienen  
25 und nicht begrenzend zu verstehen sind. Dem Fachmann sind aufgrund der Beschreibung und der Beispiele weitere Ausführungsformen zugänglich, die nicht über den Rahmen der Erfindung und den Umfang der anhängenden Ansprüche hinausgehen.

### **Kurze Beschreibung der Zeichnungen:**

**Abbildung 1: Schematische Darstellung eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins.** Das Fusionsprotein besteht aus einem N-terminal gelegenen Sekretionssignal, einer C-terminal lokalisierten Transmembran- und cytoplasmatischen Domäne eines Histokompatibilitätsantigens und einer integrierten kompletten oder partiellen Sequenz eines Antigens.

**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Kassetten für die Expression von Fusionsproteinen.** SP: Signalpeptid; MCS: multiple Klonierungsstelle; TM: Transmembrandomäne; MHC Tail: cytoplasmatischer Schwanz eines MHC-Moleküls; Antigen: Sequenz kodierend für ein Antigen, gegen das Immunantworten induziert werden sollen

**Abbildung 3: Testen der Auswirkung unterschiedlicher RNA-Dosen auf die Frequenz antigenspezifischer CD4+-T-Lymphozyten.**

$1 \times 10^6$  aufgereinigte CD4+-Lymphozyten wurden über 1 Woche mit  $2 \times 10^5$  DC kokultiviert, welche mit RNA in den angegebenen Mengen (0,1-10  $\mu\text{g}$  RNA) per Elektroporation transfiziert worden waren. Am Tag 7 nach Stimulation wurde ein ELISPOT unter Standardbedingungen zum Nachweis Interferon-gamma-sezernierender T-Lymphozyten durchgeführt. Als Antigen-präsentierende Zellen wurden DC desselben Spenders, die mit überlappenden pp65-Peptiden (1,75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) oder einem irrelevanten Kontrollpeptid beladen worden waren, verwendet. Für den Test wurden  $3 \times 10^4$  Effektoren mit  $2 \times 10^4$  DC für 16 h koinkubiert. Nach Standardentwicklung wurde die Anzahl der IFN-gamma-sezernierenden T-Lymphozyten mittels einer Software-basierten Videoauswertung bestimmt. Im Vergleich zu der CMVpp65standard-RNA zeigt sich eine massive Expansion von CD4+-Lymphozyten sowohl durch das CMVpp65-TM1- als auch durch das CMVpp65-TM2-Konstrukt.

**Abbildung 4: Testen der Auswirkung unterschiedlicher RNA-Dosen auf die Frequenz Interferon-gamma-sezernierender CD8+-T-Lymphozyten.**

1 x 10<sup>6</sup> aufgereinigte CD8+-Lymphozyten wurden über 1 Woche mit 2 x 10<sup>5</sup> DC kokultiviert, welche mit RNA in den angegebenen Mengen (0,1-10 µg RNA) per Elektroporation transfiziert worden waren. Am Tag 7 wurde ein Standard ELISPOT zum Nachweis IFN-gamma-sezernierender T-Lymphozyten gegen DC desselben Spenders durchgeführt, welche mit überlappenden pp65-Peptiden (1,75 µg/ml) oder einem irrelevanten Kontrollpeptid beladen worden waren. Es wurden 3 x 10<sup>4</sup> Effektoren mit 2 x 10<sup>4</sup> DC für 16 h koinkubiert. Nach Standardentwicklung wurde die Anzahl der IFN-gamma-sezernierenden T-Lymphozyten mittels einer Software-basierten Videoauswertung bestimmt. Es zeigte sich eine massive Expansion von CD8+-Lymphozyten durch das CMVpp65-TM1- und das CMVpp65-TM2-Konstrukt. Selbst bei Verwendung von 100x geringeren Dosen (0,1 µg RNA) liegt die Frequenz der pp65-spezifischen CD8+-Lymphozyten noch über dem Hintergrund nach Stimulation durch mit NYESO-RNA transfizierten DC (Daten nicht gezeigt). Die Stimulation durch das CMVpp65standard-Konstrukt zeigte erst ab 2,5 µg eine Expansion von pp65-spezifischen Lymphozyten über das Niveau des Hintergrunds hinaus.

**Abbildung 5: Dosis/Wirkungs-Profil für die Expansionskapazität verschiedener Immunogene auf Antigen-spezifische Lymphozyten.** Die erfindungsgemäß modifizierten Immunogene weisen eine deutlich gesteigerte Potenz (>100x) und eine höhere maximale Wirkung auf.

**Abbildung 6: Vergleichender Test der Auswirkung von erfindungsgemäß modifizierten Immunogenen und Standardimmunogenen auf die Generierung von cytotoxischen Immunantworten.** 1 x 10<sup>6</sup> aufgereinigte CD8+-Lymphozyten wurden über 1 Woche mit 2 x 10<sup>5</sup> DC kokultiviert, welche mit 10µg RNA per Elektroporation transfiziert worden waren. Am Tag 7 wurde ein Standard Cytochrom-Cytotoxizitätstest gegen DC desselben Spenders durchgeführt, welche mit unterschiedlichen Konzentrationen

überlappender pp65-Peptide oder einem irrelevanten Kontrollpeptid beladen worden waren. Es wurden  $15 \times 10^4$  Effektoren mit  $0,5 \times 10^4$  DC für 4 h koinkubiert. Nach Messung des Überstandes im Counter wurde die spezifische Lyse berechnet, gemäß der Formel: Es zeigte sich eine starke Lyse durch CD8+-Lymphozyten, welche mit CMVpp65-TM1- und CMVpp65-TM2-Konstrukten stimuliert worden waren, die bis zu einer Konzentration von 10 nM des pp65-Peptid-Gemisches über dem Wert für das Kontrollpeptid lag (Daten nicht gezeigt). Durch das pp65-Peptid-Gemisch wurden ebenfalls CD8+-Lymphozyten expandiert, die eine deutliche spezifische Lyse zeigten, aber nicht das Niveau von CMVpp65-TM1 und -TM2 erreichten. Durch das CMVpp65standard-Konstrukt konnte nur eine schwache Stimulation pp65-spezifischer cytotoxischer T-Zellen erreicht werden.

**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Kassetten für die Expression von Fusionsproteinen.** CS: Klonierungsstelle; TM: Transmembrandomäne; SNARE: SNARE-Protein oder -Motiv; Antigen: Sequenz kodierend für ein Antigen, gegen das Immunantworten induziert werden sollen

**Abbildung 8: In den Beispielen verwendete Sequenzen** HLA-Klasse I-TM-CM: Transmembran-cytoplasmatische Region eines HLA-Klasse I-Moleküls; HLA-Klasse II-TM-CM: Transmembran-cytoplasmatische Region eines HLA-Klasse II-Moleküls

**Abbildung 9: Sequenzen von Transmembran-cytoplasmatischen Regionen bzw. cytoplasmatischen Regionen von MHC-Molekülen.** Die Sequenzen zeigen die Transmembran-cytoplasmatische Region bzw. nur die cytoplasmatische Region verschiedener HLA Moleküle. Die Transmembranregion ist unterstrichen und fett.

**Abbildung 10: Sequenzen von SNARE-Proteinen.** Diese Sequenzen sind für eine Konstruktion der erfindungsgemäßen SNARE-Antigen-Fusionsmoleküle (N-SNARE-Antigen) geeignet.

## 5 Beispiele:

### Beispiel 1: Herstellung der modifizierten Vakzine

Für die Herstellung der modifizierten Vakzine wurde zunächst in einem  
 10 Expressionsvektor, welcher die Transkription von RNA erlaubt, eine Kassette hergestellt, die die Expression von Fusionsgenen erlaubt. Hierfür wurde zunächst die Nukleinsäure, die für ein Signalpeptid eines HLA-Moleküls kodiert, aus menschlichen Lymphozyten amplifiziert und das Fragment als cDNA in einen Vektor kloniert (SEQ ID NO: 1 und 2). Die Klonierung wurde  
 15 so durchgeführt, dass hinter der cDNA des Signalpeptids verschiedene Restriktionsenzym-Schnittstellen lagen und sich weitere Fragmente „in-frame“ in die Expressionskassette klonieren lassen. Als Vektoren wurden Plasmide ausgewählt, die über einen 5'-gelegenen RNA-Polymerase-Promoter T3, T7 bzw. SP6 eine in vitro-Expression von RNA erlauben. Als nächstes  
 20 Fragment wurde eine cDNA in diesen Vektor kloniert, welche eine Transmembrandomäne und die cytoplasmatische Domäne eines HLA-Klasse I (SEQ ID NO: 3 und 4) bzw. eines Klasse II (SEQ ID NO: 5 und 6) Moleküls, einschließlich Stop-Codon kodiert. Die Klonierung wurde so durchgeführt, dass das entstehende Plasmid zwischen den beiden Fragmenten noch  
 25 Restriktionsenzym-Schnittstellen zur Klonierung von Antigenen (SEQ ID NO: 7 und 8 und Abbildung 1) aufweist. In diese Expressionskassetten wurde als Modellantigen die für das humane Cytomegalovirus Phosphoprotein 65 (pp65) kodierende Sequenz (SEQ ID NO: 9 und 10) so einkloniert, dass ein durchgehender ORF aus HLA-Signalsequenz, pp65 und HLA-  
 30 Transmembran- und cytoplasmatischer Domäne (SEQ ID NO: 11 und 12) entstand. Für Kontrollexperimente wurde ein Vektor hergestellt, der die pp65-Sequenz mit einem STOP-Codon in demselben Ausgangsvektor ohne

die besagten Fragmente enthielt. Für die weitergehenden Experimente wurden folgende Nukleinsäuren genutzt:

**CMVpp65 standard:** unmodifizierte CMVpp65-Sequenz, Standard-immunogen

**CMVpp65-TM1:** Fusionsnukleinsäure aus folgenden Fragmenten: HLA-Klasse I-Sekretionssignal, pp65-ORF und HLA-Klasse I-Transmembran- und cytoplasmatische Domäne (modifiziertes Immunogen).

**CMVpp65-TM2:** Fusionsnukleinsäure aus folgenden Fragmenten: HLA-Klasse I-Sekretionssignal, pp65-ORF und HLA-Klasse II-Transmembran- und cytoplasmatische Domäne (modifiziertes Immunogen).

## **Beispiel 2: Testen der modifizierten Vakzine**

Die drei Nukleinsäuren (CMVpp65standard, CMVpp65TM1, CMVpp65TM2) wurden als Immunogen in Stimulationsversuchen mit autologen DC's antigenpositiver Spender eingesetzt. Um CD4- und CD8-Immunantworten getrennt zu testen, wurden aufgereinigte CD4+- und CD8+-Lymphozyten genutzt. Als Read-Out wurde der Enzyme-linked-Immuno-Spot-Assay (ELISPOT) eingesetzt, der als Standardtest zur Quantifizierung IFN- $\lambda$ -sezernierender T-Zellen, anerkannt ist. Zum Testen der Effektorfunktion von CD8+-T-Lymphozyten wurde ein Standard-Chrom-Freisetzungstest benutzt. Autologe Monozyten oder DC's wurden mit pp65-RNA, CMVpp65-TM1- und CMVpp65-TM2-Immunogenen transfiziert. Als Maximal-Stimulationskontrolle wurden DC's mit überlappenden Peptiden für pp65 sowie mit Kontrollpeptid beladen. Die so behandelten DC's wurden über Nacht oder für 7 Tage mit CD4+- oder CD-8+-Lymphozyten koinkubiert. Das Read-Out erfolgte gegen autologe Monozyten oder DC's, die mit pp65-überlappenden Peptiden oder einem CMV-Fibroblastenlysate gepulst worden waren. Bei der Untersuchung von CD4+- Immunantworten zeigte sich



überraschenderweise, dass beide modifizierten Immunogene (CMVpp65-TM1 und CMVpp65-TM2) nicht nur eine gegenüber CMVpp65standard-Immunogen verstärkte Immunantwort auslösten, sondern auch eine maximal starke antigenspezifische IFN-gamma-Sekretion bei CD4+-Lymphozyten induzierten (Abbildung 3). Der Prozentsatz der antigenspezifischen CD4+-Zellen nach Stimulation durch die modifizierten pp65-Konstrukte war dabei gleich oder sogar höher als nach Stimulation mit pp65 überlappenden Peptiden. Wie erwartet, zeigte das CMVpp65standard-Immunogen keine relevante Stimulation von CD4+-Lymphozyten.

Ein noch überraschenderes Ergebnis ergab sich bei der Untersuchung von CD8-Immunantworten nach Stimulation mit den Immunogenen. Es ließ sich zeigen, dass die Verwendung der modifizierten Expressionskassetten zur Stimulation von CD8+-Lymphozyten ebenfalls zu einem Anteil spezifisch IFN- $\lambda$ -sezernierender Zellen führte, welcher dem nach Stimulation mit pp65 überlappenden Peptiden vergleichbar ist. Überraschenderweise waren auch hierbei die modifizierten RNA-Konstrukte den unveränderten CMVpp65standard-Immunogenen weit überlegen (Abbildungen 4 und 5). Die Ergebnisse im Zytotoxizitätsassay zeigten, dass beide Modifikationen zur einer bisher noch nicht beschriebenen drastischen Erhöhung der Cytotoxizität im Vergleich zu CMVpp65standard RNA führten (Abbildung 6). Auch hierbei zeigte sich überraschenderweise eine Überlegenheit der modifizierten Immunogene gegenüber den überlappenden pp65-Peptiden.

In einer Serie von Experimenten wurden zusammenfassend mehrfach bestätigt folgende Resultate erzielt:

- Die modifizierten Immunogene führen zu einer deutlich verstärkten Stimulation und Expansion von Antigen-spezifischen CD4+-Lymphozyten (gesteigerte Vermehrung von CD4+-Lymphozyten)

- Die modifizierten Immunogene führen zu einer deutlich verstärkten Stimulation und Expansion von Antigen-spezifischen CD8+-Lymphozyten (gesteigerte Vermehrung von CD8+-Lymphozyten)

5 • Die modifizierten Immunogene führen zu einer deutlich verstärkten Zytokinausschüttung von Antigen-spezifischen CD4+-Lymphozyten und CD8+-Lymphozyten (gesteigerte Zytokinausschüttung=gesteigerte Aktivierung)

10 • Die modifizierten Immunogene führen zu einer deutlich verstärkten cytotoxischen Reaktivität von Antigen-spezifischen CD8+-Lymphozyten (gesteigerter zytotoxischer Effekt)

• Die modifizierten Immunogene sind 100x potenter bezüglich der  
15 Expansion von Antigen-spezifischen CD8+-Lymphozyten

- Die modifizierten Immunogene haben selbst bei 100x niedrigerer Dosis einen stärkeren Effekt auf die Expansion von Antigen-spezifischen CD4+-Lymphozyten als Standard-Immunogene

20

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die erfindungsgemäßen Modifikationen eines Antigens in einer über 100-fach gesteigerten Potenz (Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve) und einer drastisch erhöhten biologischen Wirksamkeit resultieren. Im Vergleich mit den bisher üblichen  
25 unmodifizierten Antigensequenzen lässt sich ein Immunogen generieren, das als Vakzine eine quantitativ und qualitativ höhere Wirksamkeit besitzt.

Ein wichtiges Resultat der Erfindung ist, dass gleichzeitig antigenspezifische CD4+- und CD8+-Lymphozyten optimal stimuliert und expandiert werden.  
30 Für die Wirksamkeit besonders von therapeutischen Vakzinen ist eine Stimulation der CD8+- und CD4+-Lymphozyten von entscheidender Bedeutung.

### Patentansprüche

1. Fusionsmolekül, das ein Antigen, eine Transmembranregion und die cytoplasmatische Region einer Kette eines MHC-Moleküls umfasst.

5

2. Fusionsmolekül nach Anspruch 1, wobei das Fusionsmolekül keine Bindedomäne einer Kette eines MHC-Moleküls umfasst.

3. Fusionsmolekül nach Anspruch 1 oder 2, wobei die  
10 Transmembranregion von einem MHC-Molekül abgeleitet ist.

4. Fusionsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die  
Transmembranregion und cytoplasmatische Region eine Sequenz umfassen,  
die der Transmembranregion in Verbindung mit der cytoplasmatischen  
15 Region eines MHC-Moleküls entspricht.

5. Fusionsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das  
Fusionsmolekül zusätzlich eine Leitsequenz umfasst.

20 6. Fusionsmolekül nach Anspruch 5, wobei die Leitsequenz von einem  
MHC-Molekül abgeleitet ist.

7. Fusionsmolekül nach Anspruch 5 oder 6, wobei das Fusionsmolekül  
folgende Anordnung aufweist: N-Terminus-Leitsequenz / Antigen /  
25 Transmembranregion / cytoplasmatische Region-C-Terminus, wobei die  
einzelnen Regionen gegebenenfalls durch Linkersequenzen voneinander  
getrennt sein können.

8. Fusionsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Antigen  
30 mehrere Antigene umfasst.

9. Nukleinsäure, die für ein Fusionsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 8 kodiert.

10. Wirtszelle, die eine Nukleinsäure nach Anspruch 9 umfasst.

5

11. Pharmazeutische Zusammensetzung, die ein oder mehrere Fusionsmoleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und/oder eine oder mehrere Nukleinsäuren nach Anspruch 9 umfasst.

10 12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11 in Form einer Vakzine.

13. Verfahren zur Erhöhung der Menge an MHC/Peptid-Komplexen in einer Zelle, wobei das Verfahren die Bereitstellung eines oder mehrerer  
15 Fusionsmoleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und/oder einer oder mehrerer Nukleinsäuren nach Anspruch 9 für die Zelle umfasst.

14. Verfahren zur Steigerung der Präsentation von  
Zelloberflächenmolekülen auf Zellen, die in der Lage sind, Antigene zu  
20 präsentieren, insbesondere B-Zellen und Makrophagen, wobei das Verfahren die Bereitstellung eines oder mehrerer Fusionsmoleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und/oder einer oder mehrerer Nukleinsäuren nach Anspruch 9 für die Zellen umfasst.

25 15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Steigerung der Präsentation von Zelloberflächenmolekülen ihrerseits die primäre Aktivierung von T-Zellen, insbesondere von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten, die gegenüber dem Antigen reagieren, verstärkt.

30 16. Verfahren zum Auslösen einer Immunreaktion bei einem Lebewesen, wobei das Verfahren die Verabreichung eines oder mehrerer

Fusionsmoleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und/oder einer oder mehrerer Nukleinsäuren nach Anspruch 9 an das Lebewesen umfasst.

17. Verfahren zur Stimulierung oder Aktivierung von T-Zellen, insbesondere CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten, in einem Lebewesen, wobei das Verfahren die Verabreichung eines oder mehrerer Fusionsmoleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und/oder einer oder mehrerer Nukleinsäuren nach Anspruch 9 an das Lebewesen umfasst.

18. Verfahren zur Behandlung, Vakzinierung oder Immunisierung eines Lebewesens, wobei das Verfahren die Verabreichung eines oder mehrerer Fusionsmoleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und/oder einer oder mehrerer Nukleinsäuren nach Anspruch 9 an das Lebewesen umfasst.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft Fusionsmoleküle von Antigenen, die dafür kodierenden Nukleinsäuren und die Verwendung derartiger Fusionsmoleküle und Nukleinsäuren. Insbesondere betrifft die Erfindung Fusionsmoleküle, die ein Antigen und die Transmembranregion und cytoplasmatische Region eines MHC-Moleküls bzw. die cytoplasmatische Region eines MHC oder eines SNARE-Moleküls umfassen.

14. Okt. 2003

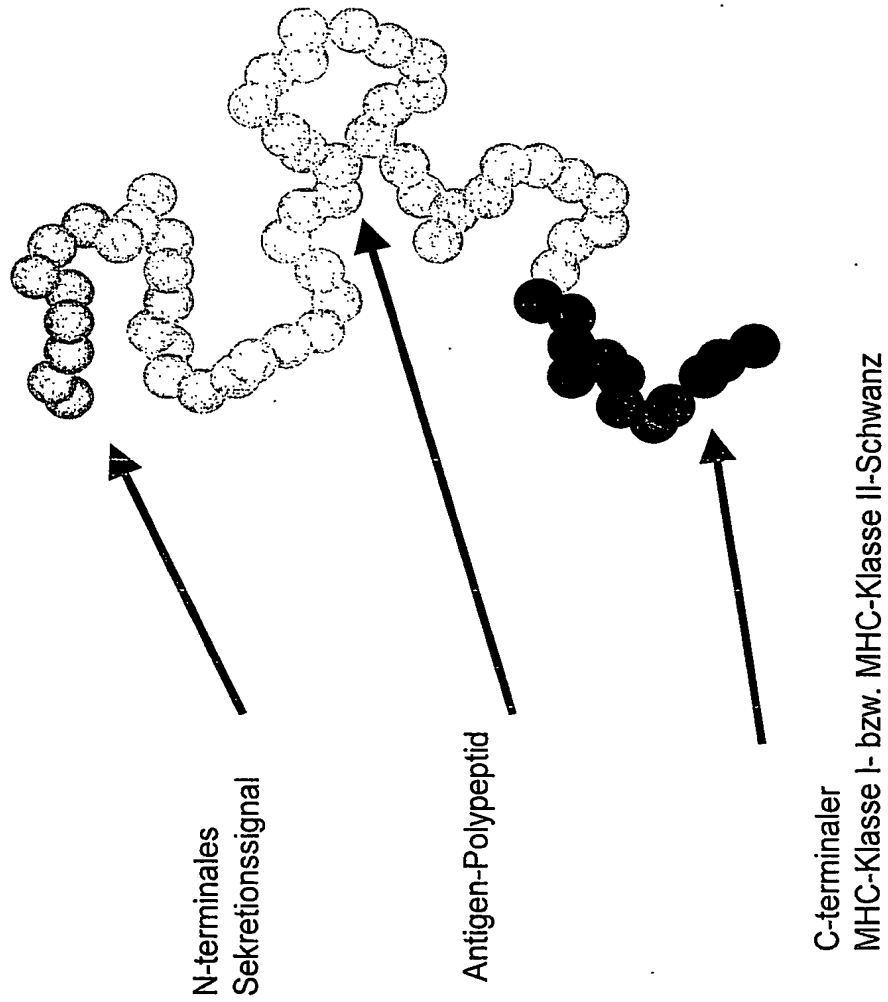
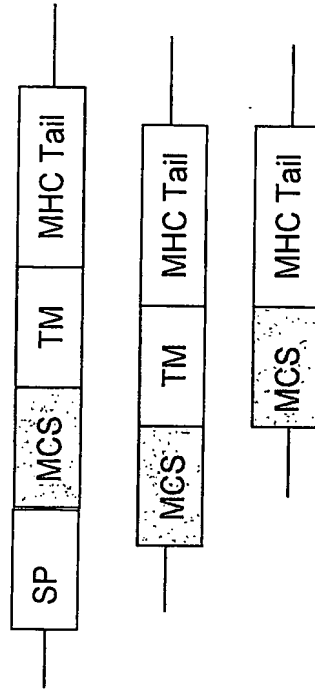


Abb. 1

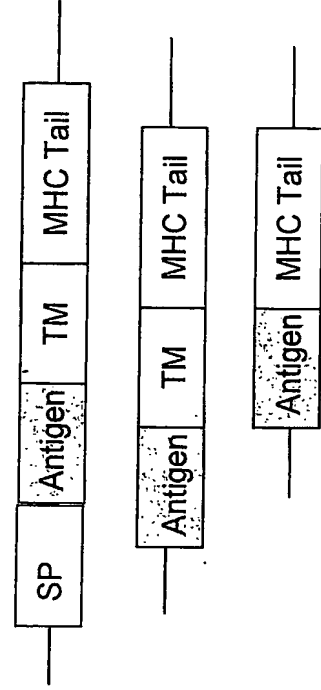


Abb. 2

Kassetten mit Klonierungsstellen (MCS) zur Expression von erfindungsgemäßen MHC-Fusionsproteinen

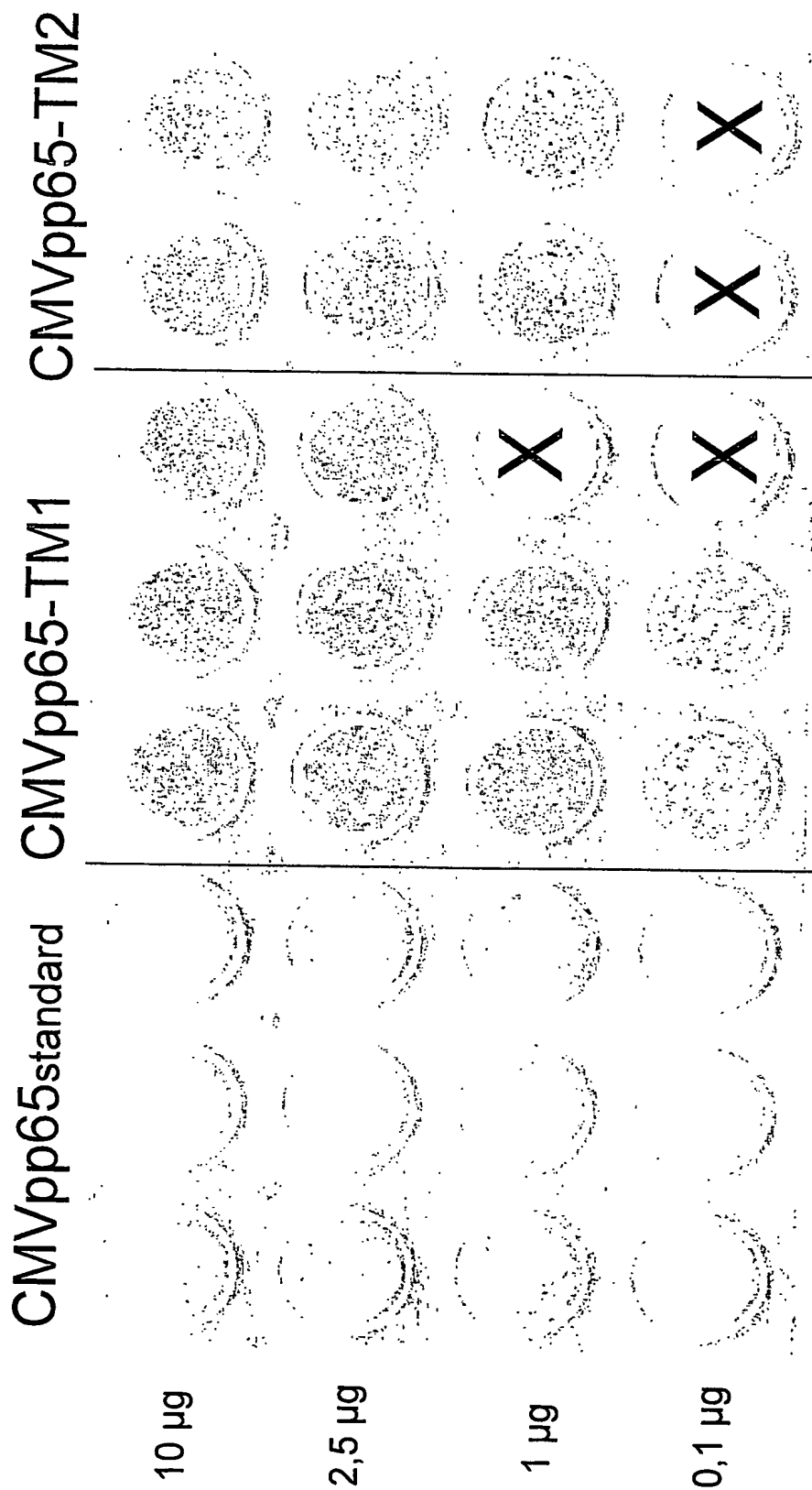


Kassetten mit einklonierten Antigenen zur Expression von erfindungsgemäßen MHC-Fusionsproteinen





BEST AVAILABLE COPY



BEST AVAILABLE COPY

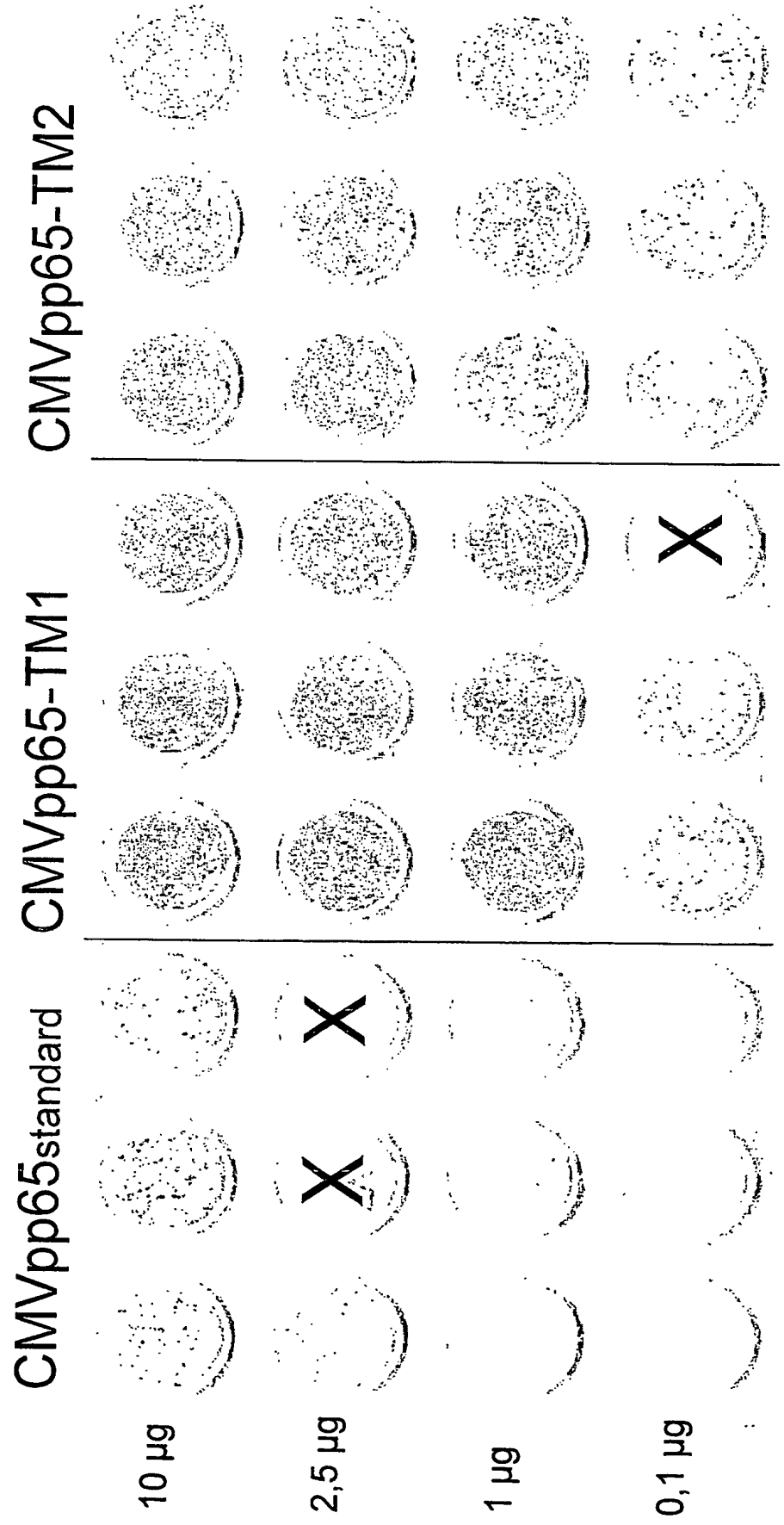


Abb. 4

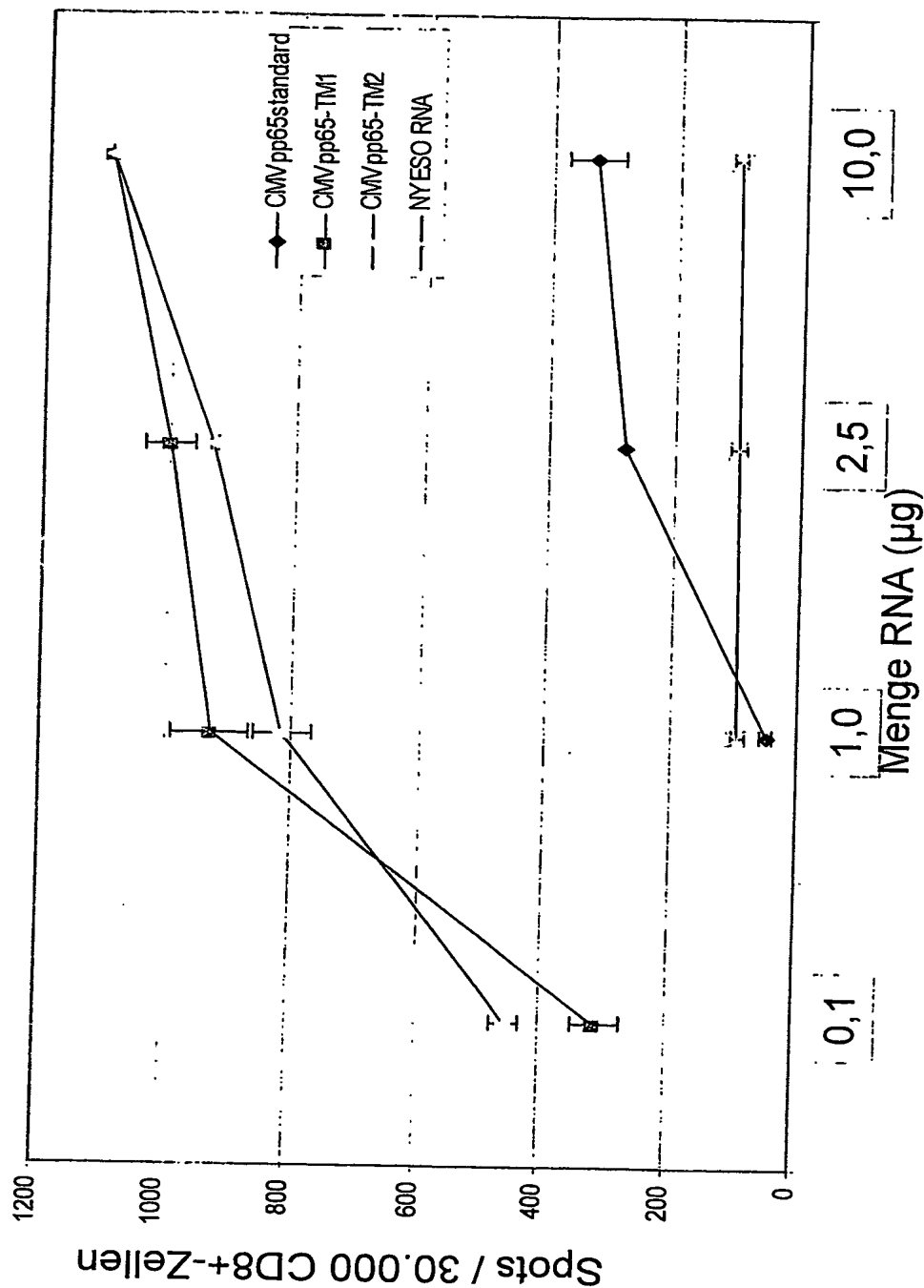


Abb. 5

Abb. 6

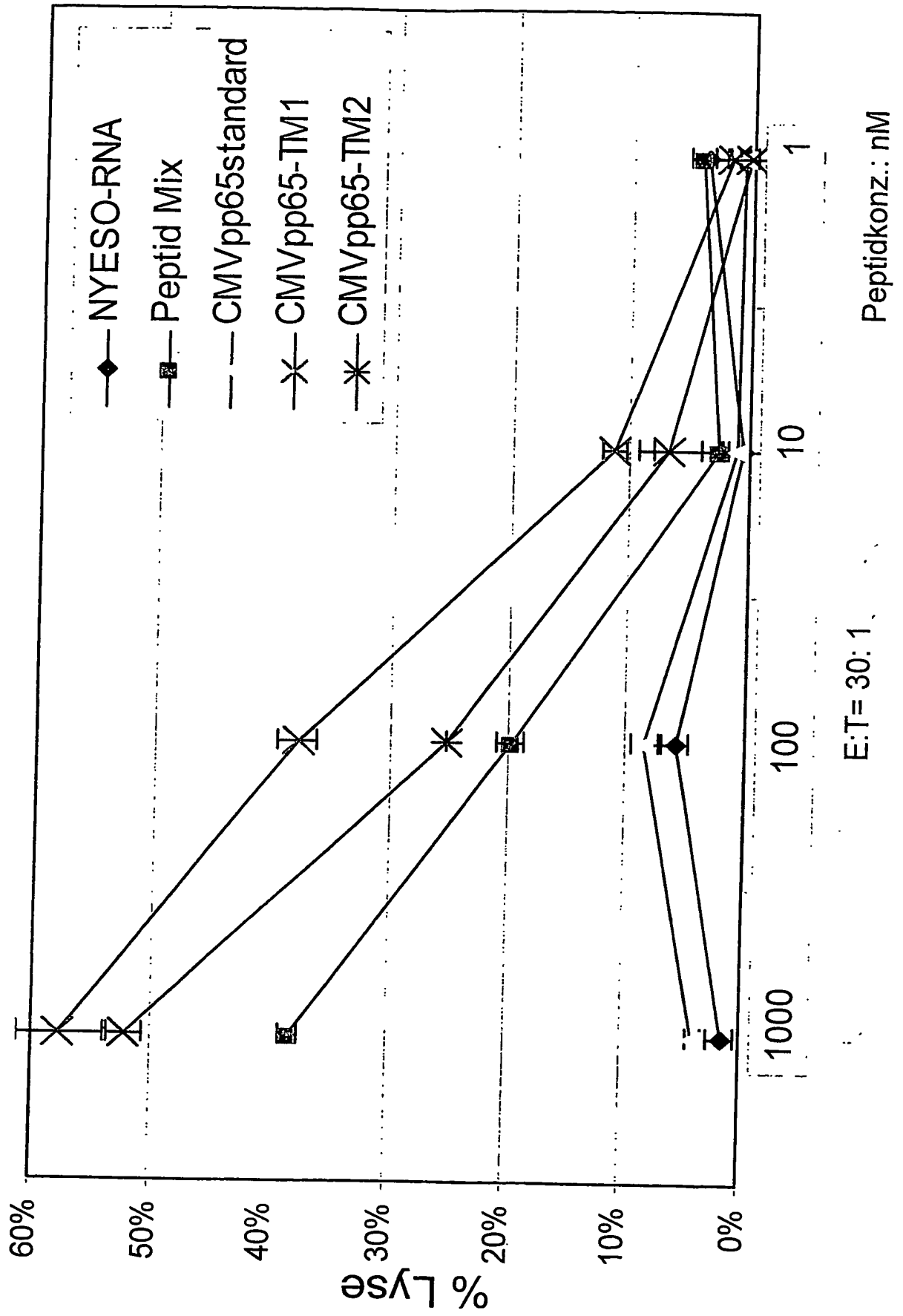
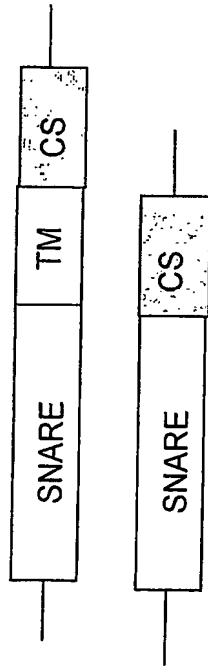




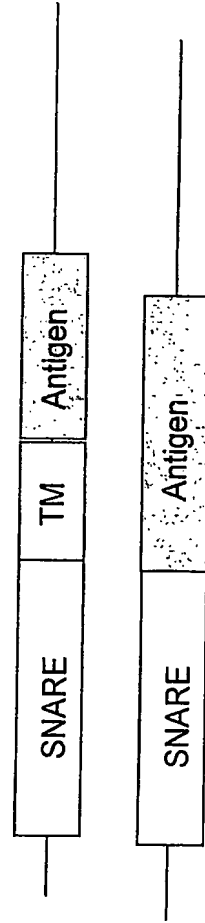
Abb. 7

Kassetten mit Klonierungsstellen (CS) zur Expression von erfindungsgemäßen SNARE-Fusionsproteinen



7/14

Kassetten mit einklonierten Antigenen zur Expression von erfindungsgemäßen SNARE-Fusionsproteinen



**Abb. 8**

[illegible]

10	pp65-Antigen	ctgcgaaccccaacgtcgccgccaccggcaagacgccttgcccgggccatgcctcgacgccccaaaaagcaccgaggt MESRRRCPEMISVLGPISGHVLKAVFSRGDTPVLPHETRLLOTHGIVHRSQPSLILVSV YTPDSTPCHRGDNLQVQHTYFTGSEVENSVNVHNPTGRSICPSQEPMSIYVYALPLKM LNIPISINVHHYPSAAERKHLPLVADAVIHASGKQMWQARLTVSGLAWTRQONQWKEPDV YYTSAFVFPTKDVALRHVVCAHELVCMSMENTRATKMQVIGDYVKVYLESEFCEVPSGKL FMHVTIGSDVEEDLTMTNRPQPFMRPHERNGFTVLCPKNMIKPGKISHIMLDVAFTSHE HFGLLCPKSIPLGISIGNLLMNGQOIFLEVQAIRETVELRQYDPAALFFEDIDLLLRG POYSEHPFTTSQYRIQKLEYRHTWRHDEGAAGQDDDDVWTSGSDSDEELVTTERTKTPRV TGGGAMAGASTSAGRKRKSASSATACTSGVMTGRGLKAESTVAPEEDTDEDSNEIHNPA VFTWPPWQAGILARNLVPMVATVQGNLKYQEFFWDANDIYRIFAELEGVWQPAAPKRRR RHRQDALPGFCIASTPKKRRG
11	SecSignal- pp65-Antigen- HLA-Klasse I- TM-CM	atgcggttcacggcgccccgaacctcatcctgctgctcgtcgtcggagccctggccctgaccgagacctggccgggtccctcgaggtcgactctagaggt ccacatggagtcgcggtcgcggtgtcccgaaatgatatccgtactgggtccattcgggcagctgctgaaagcgtgttagtcgcgcgatagac gcccgtgctgcgcacgagcagactcctcgacaggggtatccacgtacgctgagccagccctgctgattggtatcgagtagcacgcccagctcg acgcatgccaccgcggaacatcagctgcaggtgcagcacacttaccgggcagcaggtggagaaactgctcggtaacatccccagcatcaactgcaacccccag gcgaagcatctgccccagcagggagccatgctgactatgtgacgctgcccgtcagatgctgaacatccccagcatcaactgcaacccccag gtcgcgccgagcgaacacccagacacccgctgctgactgacgtgattcaacgtcagcttcttccacgaagcagatggcagcgctcagcgtctcgga etggcctggacgctcagcagaaccagtggaaagacccgacgtctactacacgtcagcttcttccacgaagcagctggcagctcgacgtcgga tgtgcgcgacagctggttctccatggagacacgcgcgaacccagatgacgtgattcagcgtcagcttcttccacgaagcagctggcagctcgga cgaagcgtgcccgcgcaagctcttatgcacgtcacgtggctgacgtggaagagcagatgacgtgacacacacccgcaaccccttcatgcg ccccagcgcgaacgctttacggtgtgtgtcccaaaatgataatcaaacgggcaagatcgacatcgacatcgacatcgacatcgacatcgac acagcattttgggtgctgtcccaagacatcccgccgtgagcattcaggttaacctgtgatgaacgggcagcagatcttcttgaggtacaagc cacccaccttaacagcagtagatcgatccagggcaagcttgataccgacacacccctggacgggcacacgaggtgcgcggcgccctcagtagagag tctggaccagcagatcggaactccgacgaactcgtaacccagcagcgaagacgcccgcgtcacggcgggcgccatggcgcgccctccacttc cgcgggcgcaaacgaaatcagcattcctggcgacggcgtgcacgtcgggcgttatgacacggcgccgcttaaggcggagtcacacgtcgcccgaa gaggacacgacgaggtatccgacaaacgaaatcccaaatccggcgtgttcacgtggcgccctggcagggcagatccttgcggcgccacacgtcgcccgaa tggtggctacggttcagggtcagaatcgaagtaccaggaattcttctggacgcaacacatctaccgcatcttcgcgcaattggaaagcgtatggca gcccgtcgcaaccccaaacgtgcgcgcacccggcaagccttgcggggcctgcacgctcgacgcccccaaacgaggtggtggtatccatcggtg ggcattgtgctggcctgctcctagcaggttggtgctcagcagctggtgctcactgtagtgtaggaggaagagctcaggtggaaaaagggaggga gctactcaggtcgctccagcagcagtgcccggtcgtcgtctcctcagcagcttga
12	SecSignal- pp65-Antigen- HLA-Klasse I- TM-CM	MRVTAPRTLILLGALALTETWAGSLQVDSRGSTMESRRRCPEMISVLGPISGHVLKA VFSRGDTPVLPHETRLLOTHGIVHRSQPSLILVSVYTPDSTPCHRGDNLQVQHTYFTGS EVENSVNVHNPTGRSICPSQEPMSIYVYALPLKMLNIPISINVHHYPSAAERKHLPLVA DAVIHASGKQMWQARLTVSGLAWTRQONQWKEPDVYVYSAFVFTKDVALRHVVCAHEL CSMENTRATKMQVIGDYVKVYLESEFCEVPSGKLFMHVTLSGSDVEEDLTMTNRPQPFMR

13	SecSignal- pp65-Antigen- HLA-Klasse II-TM-CM	<p>           PHERGFTVLCPKNMIKPKGISHIMLDVAFTSHEHFGLLCPKSIPLGISISGNLLMNGQQ            IFLEVQAIRETVELRQYDPVAALFFFDIDLLQRGPOYSEHPTFTSQYRIQKLEYRHTW            DRHDEGAAQDDDDVWTSGSDSDEELVTTERKTPTVTPGGAMAGASTSAGRKRKKSASSATA            CTSGVMTGRGLKAESTVAPEEDTDESDNEIHNPVFTWPPWQAGILARNLVPVMTVQVQ            QNLKYQEFFWDANDIYRIFAELEGVWQPAAPKRRHRQDALPGPCIASTPKKHRRGGSIV            GIVAGLAVLVVIGAVVATVMCRKSSGKGGSYSAASSDSAQGSDVSLTA         </p> <p>           atgagggtcacggcgccccgaaccctcatcctgctgctcgcggagccctggccctgacgagacacctggccgggtccctcgagtcgactcgacttagaggat            ccaccatggagtcgcgcggtgcgcgttgcctccgaaatgataccgtaactgggtcccatttcggggcacgtgctgaaagccgtgtttagtcggcgcatatc            gccgggtgctgcgcacagacgacgactcctgcagacgggtatccacgtacgcgtgagccagccctcgctgacttgggtatcgagtaacacgcccactcg            acgcatgccacccggcgacaaatagctgcaggtgcagcacgacttaccggcgagcaggtggagaacgtgctcggtcaacgtgcacacccccacgg            gccgaagcatctgccccagccagggagcccatgctgatatgtgtacgcgtgcgcgtcaagatgctgaacatccccagcatcaacgtgcacccactaccc            gtgcggcgagcgcaaacacccgacacctgccgtgtagtgcgctgactacacgtcaggttcggtttcccaacaaagacgtggcactgcggcgacgtgg            ctggcctggacgctcagcagaaccagtggaaagacccgcgcgaacaaagatgcaggtgtaggtgacacgtacgtcaagggtgacactgcggcgacgtgg            tgtgcgcgacgagctggttgcctccatggagaaacacgcgcgaacaaagatgcaggtgtaggtgacacgtacgtcaagggtgacactgcggcgacgtgg            cgaggacgtgccctccggcaagctcttatgcagctcacgtggcctgcagtggaagagacacgtgacgtgacccgcaaccccgcaacccctcatgcgc            cccacgagcgcaacggcttacgggtgtgtgtcccaaaatagataatacaacccgggcaagatctcgacatcatgctggtggttttaccctcac            acgagcattttgggctgctgtcccaagacatccccggcctgacatctcaggttaacctgtgatgaacggcgacgacatcttccctggaggtacaagc            catacggagacccgtggaactgcgtcagtagcgtccccggcgtgcacgtcgggcgttatgacacgcgcgccttaaggccagtcacacgtgcgcgcgaa            caccacacctcaccagccagtagcgtccaggcgaagttgtagtaccgacacacccggcgcgcgtcacggcgcgcccatggcgccgctccacttc            tctggaccagcggtcggactccgacgaagaaactcgtgaacacacggcgcaagacggcgcgcgtcacggcgcgcccatggcgccgctccacttc            cgggcgccgcaaacgcaaatcagcatcctcgcgacggcgtgcacgtcgggcgttatgacacgcgcgccttaaggccagtcacacgtgcgcgcgaa            gagacacccagcaggtattccgacaaacgaaatccacatccggcgtgttcacactggcgcgcctggcagggcgacatcctggccgcaacctggtgcca            tgggtgctacggttcaggtcagaatctgaagtaccaggaattcttctggacgcaacacgacatctaccgcatcttcgcgaatttggaagcgatggca            gcccgctgcgaaccccaacgtcgccgccaacggcgaacgccttgcggggcgcgtgcatcgctcgacgcccaaaaagcaccgaggtggatccccagagc            aagatgctgagtgagtcgggggcttctgctgctggcctgctcttcttggggcgccggtgttcatctacttcagggaatcagaaaggacactctggacttc            agccaagagagattcctgagctga         </p>
14	SecSignal- pp65-Antigen- HLA-Klasse II-TM-CM	<p>           MRVTAPRTLILLSGALALTETWAGSLQVDSRGSTMESRRRCPEMISVLGPISGHVLKA            VFSRGDTPVLPHETRLQGTGIHVRVSQPSLILVSQYTPDSTPCHRGDNQLQVQHTYFTGS            EVENSVNVNHNPTGRSICPSQEPMSIYVYALPLKMLNIPSIINVHYPSSAERKHLPLVA            DAVTHASGQMWOARLTVSGLAWTRQONQWKEPDVYTSFAVFETKDVLRHVVCACHELV            CSMNTRATKMQVIGDQYVKVYLESCFEDVPSGKLFMHVTLGSDVEEDLTMRNPQPEMR            PHERNGFTVLCPKNMIKPKGISHIMLDVAFTSHEHFGLLCPKSIPLGISISGNLLMNGQQ            IFLEVQAIRETVELRQYDPVAALFFFDIDLLQRGPOYSEHPTFTSQYRIQKLEYRHTW            DRHDEGAAQDDDDVWTSGSDSDEELVTTERKTPTVTPGGAMAGASTSAGRKRKKSASSATA            CTSGVMTGRGLKAESTVAPEEDTDESDNEIHNPVFTWPPWQAGILARNLVPVMTVQVQ            QNLKYQEFFWDANDIYRIFAELEGVWQPAAPKRRHRQDALPGPCIASTPKKHRRGGSQS            KMLSGVGGEFVLGLLFLGAGLFIYFRNQKHSGLQPRGFLS         </p>



**Abb. 9:**

Seq ID No	Typ	Name	Sequenz
15	MHC	HLA-A	<u>PSSQPTIPVGI</u> <u>IAGLVLF</u> <u>GAVITG</u> <u>AVVAAVM</u> <u>WRRKSSDR</u> <u>KGGSYQA</u> <u>ASSDSAQ</u> <u>GS</u> <u>DVSLTACKV</u>
16	MHC		<u>GSYSQA</u> <u>ASSDSAQ</u> <u>GS</u> <u>DVSLTACKV</u>
17	MHC	HLA-B	<u>PSSQSTVPI</u> <u>VGIVAG</u> <u>LAVLAV</u> <u>VVIGAV</u> <u>VVAAVM</u> <u>CRRKSSGG</u> <u>KGGSYQA</u> <u>ACSDSAQ</u> <u>GS</u> <u>DVSLTA</u>
18	MHC		<u>GSYSQA</u> <u>ACSDSAQ</u> <u>GS</u> <u>DVSLTA</u>
19	MHC	HLA-C	<u>PSSQPTIPVGI</u> <u>VAGLAV</u> <u>LAVLAV</u> <u>LAVL</u> <u>GAMVAV</u> <u>VMCRRKSSGG</u> <u>KGCSQA</u> <u>ASSNSAQ</u> <u>GS</u> <u>DES</u> <u>LIACKA</u>
20	MHC		<u>SAQGS</u> <u>DES</u> <u>LIACKA</u>
21	MHC	HLA-E	<u>PASQPTIPVGI</u> <u>IAGLVLG</u> <u>SVVGAV</u> <u>VAAV</u> <u>IWRKSSGG</u> <u>KGGSYKA</u> <u>EWS</u> <u>SDSAQ</u> <u>GSE</u> <u>SHSL</u>
22	MHC		<u>GSYSKA</u> <u>EWS</u> <u>SDSAQ</u> <u>GSE</u> <u>SHSL</u>
23	MHC	HLA-F	<u>QSPQPTIPVGI</u> <u>VAGLV</u> <u>LVGAV</u> <u>VTGAV</u> <u>VAAVM</u> <u>WRRKSSDR</u> <u>NRGSYQA</u> <u>AVT</u> <u>DSAQ</u> <u>G</u> <u>SVSLTANKV</u>
24	MHC		<u>RNRGSYQA</u> <u>AVT</u> <u>DSAQ</u> <u>G</u> <u>SVSLTANKV</u>
25	MHC	HLA-Dra	<u>VVCALGL</u> <u>TVGLVGI</u> <u>IIGT</u> <u>FIIF</u> <u>IKGLR</u> <u>KSNAA</u> <u>ERRG</u> <u>PL</u>
26	MHC		<u>RKSNA</u> <u>AERRG</u> <u>PL</u>
27	MHC	HLA-DRb	<u>MLSGVG</u> <u>GFVLGLL</u> <u>FLAG</u> <u>LFIYFR</u> <u>NQK</u> <u>HSG</u> <u>LQ</u> <u>PRG</u> <u>FLS</u>
28	MHC		<u>GHSGL</u> <u>Q</u> <u>PRG</u> <u>FLS</u>
29	MHC	HLA-Dqa	<u>VVCALGL</u> <u>SVGLM</u> <u>GI</u> <u>V</u> <u>GV</u> <u>TV</u> <u>FLIQ</u> <u>GLR</u> <u>SV</u> <u>GAS</u> <u>RHQ</u> <u>G</u> <u>PL</u>
30	MHC		<u>VGAS</u> <u>RHQ</u> <u>G</u> <u>PL</u>
31	MHC	HLA-DQb	<u>MLSGIG</u> <u>GFVLGL</u> <u>IFLGL</u> <u>GLIIH</u> <u>RRS</u> <u>QKGL</u> <u>LH</u>
32	MHC		<u>RSQKGL</u> <u>LH</u>
33	MHC	HLA-DPa	<u>VL</u> <u>CAL</u> <u>GLV</u> <u>LG</u> <u>LV</u> <u>GI</u> <u>V</u> <u>TV</u> <u>FLI</u> <u>IK</u> <u>SLR</u> <u>SGH</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>RAQ</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>L</u>
34	MHC		<u>RS</u> <u>GH</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>RAQ</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>L</u>
35	MHC	HLA-DPb	<u>TLT</u> <u>GAG</u> <u>GFVLGL</u> <u>II</u> <u>CG</u> <u>V</u> <u>GI</u> <u>F</u> <u>M</u> <u>HRR</u> <u>R</u> <u>SK</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>A</u>
36	MHC		<u>SK</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>A</u>
37	MHC	CD1a	<u>FI</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>W</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>F</u> <u>C</u>
38	MHC		<u>R</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>F</u> <u>C</u>
39	MHC	CD1b	<u>IV</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>W</u> <u>M</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>P</u>
40	MHC		<u>RR</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>P</u>
41	MHC	CD1c	<u>W</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>W</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>H</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>L</u>
42	MHC		<u>K</u> <u>K</u> <u>H</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>L</u>

Abb. 10:

SEQ ID NO	Typ	Name	Sequenz
43	SNARE	Cis-golgi SNARE p28	MAAGTSSWE DLRKQARQLE NELDKLVSF SKLCTSYSHS STRDGRDRY SSDTPLLNG SSQDRMFETM AIEIEQLLAR ITGVNDKMAE YTNSAGVPSL NAALMHTLQR HRDILQDYTH EFHKTKANEM AIRERENLMG SVRKDIESYK SSGGVNNRRT ELFLKEHDHL RNSDRLEIET ISIAMATKEN MTSQRGMLKS IHKMNMTLAN RFPVAVNSLIQ RINLRKRDS LILGGVIGIC TILLLLYAFH
44	SNARE	VT11b	MGASLTSPGT QEKLRDFDE KQGEANKMLT QMEELHYAP VSEHNPMSK LDYQKDLAQ FHLEARTMPG DRGDMKYGT AVENEHMRNL QSQRAMLLQG TKSLGRATQE TDQIGSEISE ELGNQRDQ
45	SNARE	Membrin	MDPLFQOTHK QVHEIQSCMG RLETADKQSV HIVENEIQAS IDQIFSRLE LELSSKEPP NKRQNALRV DQKYDVQHL QTALRNFQHR RHAREQQRQ REELLSRTFT TNDSDTTIPM DESLOFNSSL QKVHNGMDDL ILDGHNILDG LRTQRLTLKG TQKKILDIAN MLGLSNTVMR LIEKRAFQDK YFMIGGMLLT CVMFLVVQY LT
46	SNARE	Pallidin	MSVPGSSPD GALTTPPYCL EAGEPTPGLS DTSPDEGLIE DLTIEDKAVE QLAEGLLSHY LPDLQRSKQA LQELTQNVV LLDLTLEQFIS KFECHSMID INALFAEAKH YHAKLVNIRK EMLMLHEKTS KKKRAIKLQ QKROKEELER EQOREKEFER EKQLTARPAK RM
47	SNARE	Syntaxin-5	MSCRDRTOEF LSACKSLQTR QNGIQTNKPA LRAVRQRSEF TIMAKRIGKD LSNTFAKLEK LTILAKRKSL FDDKAVEIEE LTYIIKQDIN SLNKQIAQLQ DFVRAKGSQS GRHLQTHSNT IVVSLQSKLA SMSNDFKSVL EVRTENLKQ RSRREQFSRA PVSALPLAPN HLGGAVALG AESHASKDVA IDMMDSRTSQ QLQLIDEQDS YIQSRADTMQ NIESTIVELG SIFQQLAHMV KEQEETIQRI DENVLGAQLD VEAHSEILK YFQSVTSNRW IMVKIFLILI VFFIIFVVFL A
48	SNARE	Syntaxin-6	MSMEDPFFV KGEVQKAVNT AQGLFQRWTE LLQDPSTATR EEDWTTNEL RNNLRSIEWD LEDLDETISI VEANPRKFNL DATELSIRKA FITSTRQVVR DMKDMSTSS VQALAEKKNR QALLGDSGSQ NWSTGTTDKY GRLDRELQRA NSHFIEEQQA QQQLIVEQQD EQLELVSGSI GVLKNMSQRI GGELEEQAVM LEDFSHELES TQSRDLNVMK KLAKVSHMTS DRRQWCAIAI LFAVLLVLI LFLVL
49	SNARE	Syntaxin-7	MSYTPGVGGD PAQLAQRISS NIOKITQCSV EIQRITNLQLG TPQDSPELRQ QLQKQQYTN QLAKETDKYI KEFGSLPTTP SEQRQRKIQK DRIVAEFTTS LTNFQKVQRQ AAEREKEFVA RVRASSRVSG SFPEDSSKER NLVSWESQTO PQVQVQDEEI TEDDLRLIHE RESSIRQLEA DIMDINEIFK DLGMMIHEQG DVIDSIEANV ENAEVHVQQA NQQLSRAADY QRKSRKTLCI IILILVIGVA IISLIWGLN H

50	SNARE	Syntaxin-8	MAPDPWFSTY DSTCQIAQEI AEKIQORNOY ERKGEKAPKL TVTIRALLQN LKEKIALIKD LLLRAVSTHQ ITQLEGDRRQ NLLDDLVTR E RLLASFKE GAEPDLIRSS LMSEEAARGA PNPWFEEPE ETRGLGFDEI RQQQKIIQE QDAGLDALSS IISRQKMGQ EIGNELDEQN EIIDDIANLV ENTDEKL RNE TRRVNMVDRK SASCGMIMVI LLLLVAIVV AVWPTN
51	SNARE	Syntaxin-10	MSLEDPPFFV RGEVQKAVNT ARGLYQRWCE LLOESAAGR EELDWTNREL RNGLRSIEWD LEDLEETIGI VEANPGKPAA QKSPSDDLDA SAVSATRYI EEQATOQLI MDEQDQQLM VSGSIQVLKH MSGRVGEELD EQGIMLDAFA QEMDHTQSRM DGLRKLAKV SHMTSDRRQW CAIAVLVGVL LVLILLFSL
52	SNARE	SYNTAXIN-10a	MSLEDPPFFV RGEVQKAVNT ARGLYQRWCE LLOESAAGR EELDWTNREL RNGLRSIEWD LEDLEETIGI VEANPGKFKL PAGDLQERKV FVERMREAVQ EMKDHMVSPT AVAFLENNR EILAGKPAAQ KSPSDDLDA AVSATRYIE EQATOQLIM DEQDQQLM VSGSIQVLKHM SGRVGEELDE QGIMLDAFAQ EMDHTQSRMD GVLRLAKVS HMTSDRRQWC AIAVLVGVL LVLILLFSL
53	SNARE	Syntaxin-11	MKDLRLAELD LSKQYDQFP DGDDEDFSPH EDIVFETDHI LESLYRDIRD IQDENQLLVA DVKRLGKQNA RFLTSMRRLS SIKRDTNSIA KAFRARGEVI HCKLRAMKEL SEAAEAQHGP HSAVARISRA QYNALTITFQ RAMHDYNQAE MKQRDNCKIR IQRQLEIMGK EVSGDQIEDM FEQGWDFVS ENLLADVGR GPPTTRSRRAA TANCACAWRAA IRDVHELFLQ MAVLVEKQAD TLNVIELNVQ KTVDTYQAK AQVRKAVQYE EKNPCRTLCC FCCPCLK
54	SNARE	Syntaxin-12	MSYGPLDMYR NPGSPGPQLR DFSSIIQTCS GNIQRISQAT AQIKNLSQL GTKQDSSKLQ ENLQQLQHST NQLAKETNEL LKELGSLPLP ISTSEQRQR LQKERLMNDF SAALNNEQAV QRRVSEKEKE SIARARAGSR LSAEERQREE QLVSFDSHEE WNQMOSQEDE VAITEQDLEL IKERETAIRQ LEADILDVNO IFKDLAMMIH DQGDLDISIE ANVESSEVHV ERATEQLORA AAYQKSRKK MCILVLVLSV IILILGLIIV LVYKTK
55		Syntaxin-17	MSEDEEKVKL RRLEPAIQKF IKIVIPTNLE RLKHKQINIE KYQRCRIWDK LHEEHINAGR TVQQLRSNIR EIEKLCLKVR KDDLVLKRM IDPVKEEASA ATAEFLQLHL ESVEELKKQF NDEETLLQPP LTRSMTVGGA FHTTEAEASS QSLTQIYALP EIPQDQNAEE SRETLEADLI ELSQLVTDFS LLVNSQQEKEI DSIADHVNSA AVNVEEGTKN LGKAAKYKLA ALPVAGALIG GMVGGPIGILL ACFKVAGIAA ALGGGVIGFT GGKLIQRKKQ KMMKLTSSC PDLPSQTDKK CS
56	SNARE	VAMP-2	MSATAATAPP AAPAGEGPP APPPNLTNR RLQOTQAQVD EVVDIMRVNV DKVLERDQKL SELDDRADAL QAGASQFETS AAKLRKYWW KNLKMMIILG VICAILIIII IVYFSS
57	SNARE	VAMP-3	MSTGPTAATG SNRRLQQTQN QVDEVVDIMR VNVDKVLERD QKLSELDRA DALQAGASQF ETSAAKLKRK YWKNCKMWA IGITVLVIFI IILIVWVVSS

58	SNARE	VAMP-4	MPPKFKRHLN DDDVTGSVKS ERRNLEDDDS DEEEDFFLRG PSGPREFGPRN DKIKHVQNQV DEVIDVMPEN ITKVIERGER LDELQDKSES LSDNATAFSN RSKQLRRQMW WRGCKIKAIM ALVAAILLV IILLIVMKYR T
59	SNARE	VAMP-7	MAILFAVVAR GTTILAKHAW CGGNFLEVTE QILAKIPSEN NKLTYSHGNY LFHYICQDRI VYLCITDDDE ERSRAFNELN EIKKRFQTTY GSRAQTALPY AMNSEFSSVL AAQLKHSEN KGLDKVMEQ AQVDELKGIM VRNIDLVAQR GERLELLIDK TENLVDSSVT FKTTSRNLAR AMCMKNLKT IILIIIVSIVF IYIIIVPLCG GFTWPSCVKK
60	SNARE	VAMP8	MEEASEGGGN DRVRNLQSEV EGVKNIMTQN VERILARGEN LEHLRNKTED LEATSEHFKT TSQKVARKFW WKNVKMIVLI CVIVFIILF IVLEATGAFS
61	SNARE	VT11-a-beta	MSSDFEGYEQ DFAVLTAET SKIARVPRLP PDEKKQMVAN VEKQLEEAKE LLEQMDLEVR EIPQSRGMY SNRMRSYKOE MGKLETDFKR SRIAYSDEVR NELLGDDGNS SENQRAHLID NTERLERSR RLEAGYQIAV ETEQIGQEML ENLSHDREKI QRARERLRET DANLGKSSRI LTGMLRRGCS VKKQCNLSLA PKA
62	SNARE	XP350893	MRDRLPDLTA CRKNDGDGTV VVVEKDHFMD DFEHQVEEIR NSIDKITQYV EEVKNHSHII LSAPNPEGKI KEELEDNKE IKKTANKIRA KLKAIEQSFD QDESGNRTSV DLRIRRTQHS VLSRKFEVAM AEYNEAQTLE RERSKGRIQR QLEITGRITT DDELEEMLES GKPSIFTSDI ISDSQITRQA LNEIESRHKD IMKLETSIRE LHEMFMDMAM FVETQGEMIN NIERNVMNAT DYVEHAKET KKAIKYQSKA RRVSLASKN
63	SNARE	LIP5	QMAALAPLPP LPAQFKSIQH HLRTAQEHDK RDPVAYYCR LYAMQTGMKI DSKTPECRKF LSKLMDQLEA LKKQLGDNEA ITQEIIVGCAX LENYALKMFL YADNEDRAGR FHKNMIKSFY TASLLIDVIT VFELTDENV KHRKYARWKA TYIHNCLKEW GDSSSRPCWE LKKIMILKKM KMLEQPLCPL SOLSHHHLQL MTQQHAIRQL YWNTDSSGCT RSS

# SEQUENCE LISTING

<110> Johannes Gutenberg-Universität Mainz, vertreten durch den Präsidenten

<120> Rekombinante Impfstoffe und deren Verwendung

<130> 410-1

<160> 63

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 78

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgcgggtca cggcgcccg aaccctcatc ctgctgctct cgggagccct ggcctgacc 60

gagacctggg ccggctcc 78

<210> 2

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Val Thr Ala Pro Arg Thr Leu Ile Leu Leu Leu Ser Gly Ala  
1 5 10 15

Leu Ala Leu Thr Glu Thr Trp Ala Gly Ser  
20 25

<210> 3

<211> 168

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atcgtgggca ttgttgctgg cctggctgtc ctagcagttg tggcatcgg agctgtggtc 60

gctactgtga tgtgtaggag gaagagctca ggtggaaaag gagggagcta ctctcaggct 120

gcgtccagcg acagtgccca gggctctgat gtgtctctca cagcttga 168

<210> 4

<211> 55

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ile Val Gly Ile Val Ala Gly Leu Ala Val Leu Ala Val Val Val Ile  
1 5 10 15

Gly Ala Val Val Ala Thr Val Met Cys Arg Arg Lys Ser Ser Gly Gly

20

25

30

Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser Ala Gln Gly  
 35 40 45

Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala  
 50 55

<210> 5  
 <211> 129  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 5  
 cagagcaaga tgctgagtgg agtcgggggc tttgtgctgg gcctgctctt ccttggggcc 60  
 gggctgttca tctacttcag gaatcagaaa ggacactctg gacttcagcc aagaggattc 120  
 ctgagctga 129

<210> 6  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Ser Lys Met Leu Ser Gly Val Gly Gly Phe Val Leu Gly Leu Leu  
 1 5 10 15

Phe Leu Gly Ala Gly Leu Phe Ile Tyr Phe Arg Asn Gln Lys Gly His  
 20 25 30

Ser Gly Leu Gln Pro Arg Gly Phe Leu Ser  
 35 40

<210> 7  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> künstliche Sequenz

<400> 7  
 ctgcaggtcg actctagagg atcc 24

<210> 8  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> künstliche Sequenz

<400> 8

Leu Gln Val Asp Ser Arg Gly Ser  
 1 5

<210> 9  
 <211> 1683  
 <212> DNA  
 <213> Cytomegalovirus

<400> 9

```

atggagtcgc gcggtcgccg ttgtcccgaa atgatatccg tactgggtcc catttcgggg      60
cacgtgctga aagccgtggt tagtcgcggc gatacgccgg tgctgccgca cgagacgcga      120
ctcctgcaga cgggtatcca cgtaacgctg agccagccct cgctgatctt ggtatcgag      180
tacacgcccg actcgacgcc atgccaccgc ggcgacaatc agctgcaggt gcagcacacg      240
tactttacgg gcagcgaggt ggagaacgtg tcggtcaacg tgcacaaccc cacggggccga      300
agcatctgcc ccagccagga gcccatgtcg atctatgtgt acgcgctgcc gctcaagatg      360
ctgaacatcc ccagcatcaa cgtgcaccac taccgctcgg cggccgagcg caaacaccga      420
cacctgcccg tagctgacgc tgtgattcac gcgtcgggca agcagatgtg gcaggcgcgt      480
ctacgggtct cgggactggc ctggacgcgt cagcagaacc agtggaaga gcccgcgctc      540
tactacacgt cagcgttcgt gtttcccacc aaggacgtgg cactgcggca cgtggtgtgc      600
gcgcacgagc tggtttgctc catggagaac acgcgcgcaa ccaagatgca ggtgataggt      660
gaccagtacg tcaagggtgta cctggagtcc ttctgcgagg acgtgccctc cggcaagctc      720
tttatgcacg tcacgctggg ctctgacgtg gaagaggacc tgacgatgac ccgcaacccg      780
caacccttca tgcgcccccga cgagcgcaac ggctttacgg tgttggtgtcc caaaaatatg      840
ataatcaaac cgggcaagat ctgcacatc atgctggatg tggcttttac ctacacgag      900
cattttgggc tgctgtgtcc caagagcatc ccgggcctga gcatctcagg taacctgttg      960
atgaacgggc agcagatctt cctggaggta caagccatac gcgagaccgt ggaactgcgt     1020
cagtacgatc ccgtggctgc gctcttcttt ttogatatcg acttgctgct gcagcgcggg     1080
ctcagtaca gcgagcacc caccctcacc agccagtatc gcatccaggg caagcttgag     1140
taccgacaca cctgggaccg gcacgacgag ggtgcgcgcc agggcgacga cgacgtctgg     1200
accagcggat cggactccga cgaagaactc gtaaccaccg agcgcaagac gccccgcgtc     1260
accggcgggc gcgccatggc gggcgccctc acttcgcgg gccgcaaacg caaatcagca     1320
tctcgggoga cggcgtgcac gtcgggcgtt atgacacgcg gccgccttaa ggccgagtc     1380
accgtcgcgc ccgaagagga caccgacgag gattccgaca acgaaatcca caatccggcc     1440
gtgttcacct ggccgccttg gcaggccggc atcctggccc gcaacctggt gcccatggtg     1500
gctacggttc agggtcagaa tctgaagtac cagggaattct tctgggacgc caacgacatc     1560
taccgcatct tcgccgaatt ggaaggcgta tggcagcccg ctgcgcaacc caaacgtcgc     1620
cgccaccggc aagacgcctt gcccgggcca tgcatcgcct cgacgcccaa aaagcaccga     1680
ggt

```

1683

<210> 10  
<211> 561  
<212> PRT  
<213> Cytomegalovirus

<400> 10

Met Glu Ser Arg Gly Arg Arg Cys Pro Glu Met Ile Ser Val Leu Gly  
1 5 10 15

Pro Ile Ser Gly His Val Leu Lys Ala Val Phe Ser Arg Gly Asp Thr  
20 25 30

Pro Val Leu Pro His Glu Thr Arg Leu Leu Gln Thr Gly Ile His Val  
35 40 45

Arg Val Ser Gln Pro Ser Leu Ile Leu Val Ser Gln Tyr Thr Pro Asp  
50 55 60

Ser Thr Pro Cys His Arg Gly Asp Asn Gln Leu Gln Val Gln His Thr  
65 70 75 80

Tyr Phe Thr Gly Ser Glu Val Glu Asn Val Ser Val Asn Val His Asn  
85 90 95

Pro Thr Gly Arg Ser Ile Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr  
100 105 110

Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val  
115 120 125

His His Tyr Pro Ser Ala Ala Glu Arg Lys His Arg His Leu Pro Val  
130 135 140

Ala Asp Ala Val Ile His Ala Ser Gly Lys Gln Met Trp Gln Ala Arg  
145 150 155 160

Leu Thr Val Ser Gly Leu Ala Trp Thr Arg Gln Gln Asn Gln Trp Lys  
165 170 175

Glu Pro Asp Val Tyr Tyr Thr Ser Ala Phe Val Phe Pro Thr Lys Asp  
180 185 190

Val Ala Leu Arg His Val Val Cys Ala His Glu Leu Val Cys Ser Met  
195 200 205

Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr Val  
210 215 220



Lys Val Tyr Leu Glu Ser Phe Cys Glu Asp Val Pro Ser Gly Lys Leu  
225 230 235 240

Phe Met His Val Thr Leu Gly Ser Asp Val Glu Glu Asp Leu Thr Met  
245 250 255

Thr Arg Asn Pro Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe  
260 265 270

Thr Val Leu Cys Pro Lys Asn Met Ile Ile Lys Pro Gly Lys Ile Ser  
275 280 285

His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu  
290 295 300

Leu Cys Pro Lys Ser Ile Pro Gly Leu Ser Ile Ser Gly Asn Leu Leu  
305 310 315 320

Met Asn Gly Gln Gln Ile Phe Leu Glu Val Gln Ala Ile Arg Glu Thr  
325 330 335

Val Glu Leu Arg Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe Phe Phe Asp  
340 345 350

Ile Asp Leu Leu Leu Gln Arg Gly Pro Gln Tyr Ser Glu His Pro Thr  
355 360 365

Phe Thr Ser Gln Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu Glu Tyr Arg His Thr  
370 375 380

Arg Asp Arg His Asp Glu Gly Ala Ala Gln Gly Asp Asp Asp Val Trp  
385 390 395 400

Thr Ser Gly Ser Asp Ser Asp Glu Glu Leu Val Thr Thr Glu Arg Lys  
405 410 415

Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met Ala Gly Ala Ser Thr Ser  
420 425 430

Ala Gly Arg Lys Arg Lys Ser Ala Ser Ser Ala Thr Ala Cys Thr Ser  
435 440 445

Gly Val Met Thr Arg Gly Arg Leu Lys Ala Glu Ser Thr Val Ala Pro  
450 455 460

Glu Glu Asp Thr Asp Glu Asp Ser Asp Asn Glu Ile His Asn Pro Ala

465

470

475

480

Val Phe Thr Trp Pro Pro Trp Gln Ala Gly Ile Leu Ala Arg Asn Leu  
 485 490 495

Val Pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys Tyr Gln Glu  
 500 505 510

Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu  
 515 520 525

Gly Val Trp Gln Pro Ala Ala Gln Pro Lys Arg Arg Arg His Arg Gln  
 530 535 540

Asp Ala Leu Pro Gly Pro Cys Ile Ala Ser Thr Pro Lys Lys His Arg  
 545 550 555 560

Gly

<210> 11  
 <211> 1962  
 <212> DNA  
 <213> künstliche Sequenz

<400> 11

atgcgggtca cggcgccccg aaccctcatc ctgctgctct cgggagccct ggccctgacc 60  
 gagacctggg ccggctccct gcaggtcgac tctagaggat ccaccatgga gtcgcgcggt 120  
 cgcggttgtc ccgaaatgat atccgtactg ggtcccatth cggggcacgt gctgaaagcc 180  
 gtgttttagtc gcggcgatac gccggtgctg ccgcacgaga cgcgactcct gcagacgggt 240  
 atccacgtac gcgtgagcca gccctcgctg atcttggtat cgcagtacac gcccgactcg 300  
 cgccatgcc accgcggcga caatcagctg caggtgcagc acacgtactt tacgggcagc 360  
 gaggtggaga acgtgtcggg caacgtgcac aaccacacgg gccgaagcat ctgccccagc 420  
 caggagccca tgtcgatcta tgtgtacgcg ctgccgctca agatgctgaa catccccagc 480  
 atcaacgtgc accactaccc gtcggcgggc gagcgcaaac accgacacct gcccgtagct 540  
 gacgctgtga ttacgcgctc gggcaagcag atgtggcagg cgcgtctcac ggtctcggga 600  
 ctggcctgga cgcgtcagca gaaccagtgg aaagagcccc acgtctacta cacgtcagcg 660  
 ttctgttttc ccaccaagga cgtggcactg cggcacgtgg tgtgcgcgca cgagctggtt 720  
 tgctccatgg agaacacgcg cgcaaccaag atgcaggtga taggtgacca gtacgtcaag 780  
 gtgtacctgg agtccttctg cgaggacgtg ccctccggca agctctttat gcacgtcacg 840  
 ctgggctctg acgtggaaga ggacctgacg atgaccgcga acccgcaacc cttcatgcgc 900

```

ccccacgagc gcaacggcctt tacggtgttg tgtcccaaaa atatgataat caaacggggc 960
aagatctcgc acatcatgct ggatgtggct ttacctcac acgagcattt tgggctgctg 1020
tgtcccaaga gcatcccggt cctgagcatc tcaggtaacc tgttgatgaa cgggcagcag 1080
atcttcctgg aggtacaagc catacgcgag accgtggaac tgcgtcagta cgatcccgtg 1140
gctgcgctct tctttttcga tatcgacttg ctgctgcagc gcgggcctca gtacagcgag 1200
caccacacct tcaccagcca gtatcgcatc cagggaagc ttgagtaccg acacacctgg 1260
gaccggcagc acgaggggtg cgcccagggc gacgacgagc tctggaccag cggatcggac 1320
tccgacgaag aactcgtaac caccgagcgc aagacgcccc gcgtcaccgg cggcggcgcc 1380
atggcgggcy cctccacttc cgcgggccgc aaacgcaaat cagcatcctc ggcgacggcg 1440
tgcacgtcgg gcgttatgac acgcggccgc cttaaggccg agtccaccgt cgcgcccga 1500
gaggacaccg acgaggattc cgacaacgaa atccacaatc cggcgtgtt cacctggccg 1560
cctggcagg ccggcatcct ggcccgaac ctggtgcca tgggtggtac ggttcagggt 1620
cagaatctga agtaccagga attcttctgg gacgccaacg acatctaccg catcttcgcc 1680
gaattggaag gcgtatggca gcccgctgcg caaccctaac gtcgccgcca ccggcaagac 1740
gccttgcccg ggccatgcat cgctcgacg ccaaaaagc accgaggtgg atccatcgtg 1800
ggcattgttg ctggcctggc tgcctagca gttgtggtca tcggagctgt ggctgctact 1860
gtgatgtgta ggaggaagag ctgagtgga aaaggaggga gctactctca ggctgcgtcc 1920
agcgacagtg ccaggggctc tgatgtgtct ctcacagctt ga 1962

```

```

<210> 12
<211> 653
<212> PRT
<213> künstliche Sequenz

```

```

400> 12
Met Arg Val Thr Ala Pro Arg Thr Leu Ile Leu Leu Leu Ser Gly Ala
1          5          10          15

Leu Ala Leu Thr Glu Thr Trp Ala Gly Ser Leu Gln Val Asp Ser Arg
20          25          30

Gly Ser Thr Met Glu Ser Arg Gly Arg Arg Cys Pro Glu Met Ile Ser
35          40          45

Val Leu Gly Pro Ile Ser Gly His Val Leu Lys Ala Val Phe Ser Arg
50          55          60

Gly Asp Thr Pro Val Leu Pro His Glu Thr Arg Leu Leu Gln Thr Gly
65          70          75          80

```

Ile His Val Arg Val Ser Gln Pro Ser Leu Ile Leu Val Ser Gln Tyr  
85 90 95

Thr Pro Asp Ser Thr Pro Cys His Arg Gly Asp Asn Gln Leu Gln Val  
100 105 110

Gln His Thr Tyr Phe Thr Gly Ser Glu Val Glu Asn Val Ser Val Asn  
115 120 125

Val His Asn Pro Thr Gly Arg Ser Ile Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met  
130 135 140

Ser Ile Tyr Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser  
145 150 155 160

Ile Asn Val His His Tyr Pro Ser Ala Ala Glu Arg Lys His Arg His  
165 170 175

Leu Pro Val Ala Asp Ala Val Ile His Ala Ser Gly Lys Gln Met Trp  
180 185 190

Gln Ala Arg Leu Thr Val Ser Gly Leu Ala Trp Thr Arg Gln Gln Asn  
195 200 205

Gln Trp Lys Glu Pro Asp Val Tyr Tyr Thr Ser Ala Phe Val Phe Pro  
210 215 220

Thr Lys Asp Val Ala Leu Arg His Val Val Cys Ala His Glu Leu Val  
225 230 235 240

Cys Ser Met Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp  
245 250 255

Gln Tyr Val Lys Val Tyr Leu Glu Ser Phe Cys Glu Asp Val Pro Ser  
260 265 270

Gly Lys Leu Phe Met His Val Thr Leu Gly Ser Asp Val Glu Glu Asp  
275 280 285

Leu Thr Met Thr Arg Asn Pro Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg  
290 295 300

Asn Gly Phe Thr Val Leu Cys Pro Lys Asn Met Ile Ile Lys Pro Gly  
305 310 315 320

Lys Ile Ser His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His  
325 330 335

Phe Gly Leu Leu Cys Pro Lys Ser Ile Pro Gly Leu Ser Ile Ser Gly  
 340 345 350

Asn Leu Leu Met Asn Gly Gln Gln Ile Phe Leu Glu Val Gln Ala Ile  
 355 360 365

Arg Glu Thr Val Glu Leu Arg Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe  
 370 375 380

Phe Phe Asp Ile Asp Leu Leu Leu Gln Arg Gly Pro Gln Tyr Ser Glu  
 385 390 395 400

His Pro Thr Phe Thr Ser Gln Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu Glu Tyr  
 405 410 415

Arg His Thr Trp Asp Arg His Asp Glu Gly Ala Ala Gln Gly Asp Asp  
 420 425 430

Asp Val Trp Thr Ser Gly Ser Asp Ser Asp Glu Glu Leu Val Thr Thr  
 435 440 445

Glu Arg Lys Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met Ala Gly Ala  
 450 455 460

Ser Thr Ser Ala Gly Arg Lys Arg Lys Ser Ala Ser Ser Ala Thr Ala  
 465 470 475 480

Cys Thr Ser Gly Val Met Thr Arg Gly Arg Leu Lys Ala Glu Ser Thr  
 485 490 495

Val Ala Pro Glu Glu Asp Thr Asp Glu Asp Ser Asp Asn Glu Ile His  
 500 505 510

Asn Pro Ala Val Phe Thr Trp Pro Pro Trp Gln Ala Gly Ile Leu Ala  
 515 520 525

Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys  
 530 535 540

Tyr Gln Glu Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala  
 545 550 555 560

Glu Leu Glu Gly Val Trp Gln Pro Ala Ala Gln Pro Lys Arg Arg Arg  
 565 570 575

His Arg Gln Asp Ala Leu Pro Gly Pro Cys Ile Ala Ser Thr Pro Lys

580

585

590

Lys His Arg Gly Gly Ser Ile Val Gly Ile Val Ala Gly Leu Ala Val  
595 600 605

Leu Ala Val Val Val Ile Gly Ala Val Val Ala Thr Val Met Cys Arg  
610 615 620

Arg Lys Ser Ser Gly Gly Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser  
625 630 635 640

Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala  
645 650

<210> 13  
<211> 1923  
<212> DNA  
<213> künstliche Sequenz

<400> 13  
atgcggggtca cggcgccccc aaccctcatc ctgctgctct cgggagccct ggccctgacc 60  
gagacctggg cgggtccct gcaggctcac tctagaggat ccaccatgga gtcgcgcggt 120  
cgccgttgtc cggaaatgat atccgtactg ggtccattt cggggcacgt gctgaaagcc 180  
gtgttttagtc gcggcgatag gcgggtgctg ccgcacgaga cgcgactcct gcagacgggt 240  
atccacgtac gcgtgagcca gccctcgctg atcttggtat cgcagtacac gcccgactcg 300  
acgccatgcc accgcggcga caatcagctg cagggtgcagc acacgtactt tacgggcagc 360  
gaggtggaga acgtgtcggg caacgtgcac aacccacagg gccgaagcat ctgccccagc 420  
caggagccca tgtcgatcta tgtgtacgag ctgccgctca agatgctgaa catccccagc 480  
atcaacgtgc accactaccc gtcggcgggc gagcgaaac accgacacct gcccgtagct 540  
acgtgtgta ttcacgcgtc gggcaagcag atgtggcagg cgcgtctcac ggtctcggga 600  
ctggcctgga cgcgtcagca gaaccagtgg aaagagcccc acgtctacta cacgtcagcg 660  
ttcgtgtttc ccaccaagga cgtggcactg cggcacgtgg tgtgcgcgca cgagctggtt 720  
tgctccatgg agaacacgag cgcaaccaag atgcaggtga taggtgacca gtacgtcaag 780  
gtgtacctgg agtccttctg cgaggacgtg ccctccggca agctctttat gcacgtcacg 840  
ctgggctctg acgtggaaga ggacctgacg atgaccgcga acccgcaacc cttcatgcgc 900  
ccccacgagc gcaacggctt tacggtgttg tgtcccaaaa atatgataat caaacggggc 960  
aagatctcgc acatcatgct ggatgtggct ttacctcac acgagcattt tgggctgctg 1020  
tgtccaaga gcatcccggt cctgagcatc tcaggtaacc tgttgatgaa cgggcagcag 1080  
atcttctggt aggtacaagc catacgcgag accgtggaac tgcgtcagta cgatcccggt 1140

gctgcgctct tctttttcga tatcgacttg ctgctgcagc gcgggcctca gtacagcgag 1200  
caccacacct tcaccagcca gtatcgcatc cagggcaagc ttgagtaccg acacacctgg 1260  
gaccggcacg acgaggggtgc cgcccagggc gacgacgacg tctggaccag cggatcggac 1320  
tccgacgaag aactcgtaac caccgagcgc aagacgcccc gcgtcaccgg cggcggcgcc 1380  
atggcggggc cctccacttc cgcgggccgc aaacgcaa atcagcatcctc ggcgacggcg 1440  
tgcacgtcgg gcgttatgac acgcggccgc cttaaggccg agtccaccgt cgcgcccga 1500  
gaggacaccg acgaggattc cgacaacgaa atccacaatc cggccgtggt cacctggccg 1560  
ccctggcagg ccggcatcct ggcccgaac ctggtgcca tgggtggctac gggtcagggt 1620  
cagaatctga agtaccagga attcttctgg gacgccaacg acatctaccg catcttcgcc 1680  
gaattggaag gcgtatggca gcccgctgcg caacccaaac gtcgcgcgcca ccggcaagac 1740  
gccttgcccg ggccatgcat cgcctcgacg cccaaaaagc accgaggtgg atcccagagc 1800  
gatgctga gtggagtcgg gggctttgtg ctgggcctgc tcttccttgg ggccgggctg 1860  
ttcatctact tcaggaatca gaaaggacac tctggacttc agccaagagg attcctgagc 1920  
tga 1923

<210> 14  
<211> 640  
<212> PRT  
<213> künstliche Sequenz  
<400> 14

Met Arg Val Thr Ala Pro Arg Thr Leu Ile Leu Leu Leu Ser Gly Ala  
1 5 10 15

Leu Ala Leu Thr Glu Thr Trp Ala Gly Ser Leu Gln Val Asp Ser Arg  
20 25 30

Gly Ser Thr Met Glu Ser Arg Gly Arg Arg Cys Pro Glu Met Ile Ser  
35 40 45

Val Leu Gly Pro Ile Ser Gly His Val Leu Lys Ala Val Phe Ser Arg  
50 55 60

Gly Asp Thr Pro Val Leu Pro His Glu Thr Arg Leu Leu Gln Thr Gly  
65 70 75 80

Ile His Val Arg Val Ser Gln Pro Ser Leu Ile Leu Val Ser Gln Tyr  
85 90 95

Thr Pro Asp Ser Thr Pro Cys His Arg Gly Asp Asn Gln Leu Gln Val  
100 105 110

Gln His Thr Tyr Phe Thr Gly Ser Glu Val Glu Asn Val Ser Val Asn  
 115 120 125

Val His Asn Pro Thr Gly Arg Ser Ile Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met  
 130 135 140

Ser Ile Tyr Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser  
 145 150 155 160

Ile Asn Val His His Tyr Pro Ser Ala Ala Glu Arg Lys His Arg His  
 165 170 175

Leu Pro Val Ala Asp Ala Val Ile His Ala Ser Gly Lys Gln Met Trp  
 180 185 190

Gln Ala Arg Leu Thr Val Ser Gly Leu Ala Trp Thr Arg Gln Gln Asn  
 195 200 205

Gln Trp Lys Glu Pro Asp Val Tyr Tyr Thr Ser Ala Phe Val Phe Pro  
 210 215 220

Thr Lys Asp Val Ala Leu Arg His Val Val Cys Ala His Glu Leu Val  
 225 230 235 240

Cys Ser Met Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp  
 245 250 255

Gln Tyr Val Lys Val Tyr Leu Glu Ser Phe Cys Glu Asp Val Pro Ser  
 260 265 270

Gly Lys Leu Phe Met His Val Thr Leu Gly Ser Asp Val Glu Glu Asp  
 275 280 285

Leu Thr Met Thr Arg Asn Pro Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg  
 290 295 300

Asn Gly Phe Thr Val Leu Cys Pro Lys Asn Met Ile Ile Lys Pro Gly  
 305 310 315 320

Lys Ile Ser His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His  
 325 330 335

Phe Gly Leu Leu Cys Pro Lys Ser Ile Pro Gly Leu Ser Ile Ser Gly  
 340 345 350

Asn Leu Leu Met Asn Gly Gln Gln Ile Phe Leu Glu Val Gln Ala Ile  
 355 360 365



Arg Glu Thr Val Glu Leu Arg Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe  
370 375 380

Phe Phe Asp Ile Asp Leu Leu Leu Gln Arg Gly Pro Gln Tyr Ser Glu  
385 390 395 400

His Pro Thr Phe Thr Ser Gln Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu Glu Tyr  
405 410 415

Arg His Thr Trp Asp Arg His Asp Glu Gly Ala Ala Gln Gly Asp Asp  
420 425 430

Asp Val Trp Thr Ser Gly Ser Asp Ser Asp Glu Glu Leu Val Thr Thr  
435 440 445

Leu Arg Lys Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met Ala Gly Ala  
450 455 460

Ser Thr Ser Ala Gly Arg Lys Arg Lys Ser Ala Ser Ser Ala Thr Ala  
465 470 475 480

Cys Thr Ser Gly Val Met Thr Arg Gly Arg Leu Lys Ala Glu Ser Thr  
485 490 495

Val Ala Pro Glu Glu Asp Thr Asp Glu Asp Ser Asp Asn Glu Ile His  
500 505 510

Asn Pro Ala Val Phe Thr Trp Pro Pro Trp Gln Ala Gly Ile Leu Ala  
515 520 525

Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys  
530 535 540

Tyr Gln Glu Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala  
545 550 555 560

Glu Leu Glu Gly Val Trp Gln Pro Ala Ala Gln Pro Lys Arg Arg Arg  
565 570 575

His Arg Gln Asp Ala Leu Pro Gly Pro Cys Ile Ala Ser Thr Pro Lys  
580 585 590

Lys His Arg Gly Gly Ser Gln Ser Lys Met Leu Ser Gly Val Gly Gly  
595 600 605

Phe Val Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gly Ala Gly Leu Phe Ile Tyr Phe

610

615

620

Arg Asn Gln Lys Gly His Ser Gly Leu Gln Pro Arg Gly Phe Leu Ser  
 625 630 635 640

<210> 15  
 <211> 66  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Pro Ser Ser Gln Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu  
 1 5 10 15

Val Leu Phe Gly Ala Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met  
 20 25 30

p Arg Arg Lys Ser Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala  
 35 40 45

Ala Ser Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala Cys  
 50 55 60

Lys Val  
 65

<210> 16  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Asp  
 5 10 15

Val Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val  
 20

<210> 17  
 <211> 63  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Pro Ser Ser Gln Ser Thr Val Pro Ile Val Gly Ile Val Ala Gly Leu  
 1 5 10 15

Ala Val Leu Ala Val Val Val Ile Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met  
 20 25 30

Cys Arg Arg Lys Ser Ser Gly Gly Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala  
35 40 45

Ala Cys Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala  
50 55 60

<210> 18  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 18

Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Cys Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Asp  
1 5 10 15

Val Ser Leu Thr Ala  
20

<210> 19  
<211> 67  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 19

Pro Ser Ser Gln Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Val Ala Gly Leu  
1 5 10 15

Ala Val Leu Ala Val Leu Ala Val Leu Gly Ala Met Val Ala Val Val  
20 25 30

Met Cys Arg Arg Lys Ser Ser Gly Gly Lys Gly Gly Ser Cys Ser Gln  
35 40 45

Ala Ala Ser Ser Asn Ser Ala Gln Gly Ser Asp Glu Ser Leu Ile Ala  
50 55 60

Cys Lys Ala  
65

<210> 20  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 20

Ser Ala Gln Gly Ser Asp Glu Ser Leu Ile Ala Cys Lys Ala  
1 5 10

<210> 21

<211> 62  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 21

Pro Ala Ser Gln Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu  
1 5 10 15

Val Leu Leu Gly Ser Val Val Ser Gly Ala Val Val Ala Ala Val Ile  
20 25 30

Trp Arg Lys Lys Ser Ser Gly Gly Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Lys Ala  
35 40 45

Glu Trp Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Glu Ser His Ser Leu  
50 55 60

<210> 22  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 22

Gly Ser Tyr Ser Lys Ala Glu Trp Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Glu  
1 5 10 15

Ser His Ser Leu  
20

<210> 23  
<211> 66  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 23

Gln Ser Pro Gln Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Val Ala Gly Leu  
1 5 10 15

Val Val Leu Gly Ala Val Val Thr Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met  
20 25 30

Trp Arg Lys Lys Ser Ser Asp Arg Asn Arg Gly Ser Tyr Ser Gln Ala  
35 40 45

Ala Val Thr Asp Ser Ala Gln Gly Ser Gly Val Ser Leu Thr Ala Asn  
50 55 60

Lys Val  
65

<210> 24  
<211> 27  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 24

Arg Asn Arg Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Val Thr Asp Ser Ala Gln  
1 5 10 15

Gly Ser Gly Val Ser Leu Thr Ala Asn Lys Val  
20 25

<210> 25  
<211> 37  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 25

Al Val Cys Ala Leu Gly Leu Thr Val Gly Leu Val Gly Ile Ile Ile  
1 5 10 15

Gly Thr Ile Phe Ile Ile Lys Gly Leu Arg Lys Ser Asn Ala Ala Glu  
20 25 30

Arg Arg Gly Pro Leu  
35

<210> 26  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 26

Arg Lys Ser Asn Ala Ala Glu Arg Arg Gly Pro Leu  
5 10

<210> 27  
<211> 38  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 27

Met Leu Ser Gly Val Gly Gly Phe Val Leu Gly Leu Leu Phe Leu Ala  
1 5 10 15

Gly Leu Phe Ile Tyr Phe Arg Asn Gln Lys Gly His Ser Gly Leu Gln  
20 25 30

Pro Arg Gly Phe Leu Ser  
35

<210> 28  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 28

Gly His Ser Gly Leu Gln Pro Arg Gly Phe Leu Ser  
1 5 10

<210> 29  
<211> 37  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 29

Val Val Cys Ala Leu Gly Leu Ser Val Gly Leu Met Gly Ile Val Val  
5 10 15

Gly Thr Val Phe Ile Ile Gln Gly Leu Arg Ser Val Gly Ala Ser Arg  
20 25 30

His Gln Gly Pro Leu  
35

<210> 30  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 30

Val Gly Ala Ser Arg His Gln Gly Pro Leu  
1 5 10

<210> 31  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 31

Met Leu Ser Gly Ile Gly Gly Phe Val Leu Gly Leu Ile Phe Leu Gly  
1 5 10 15

Leu Gly Leu Ile Ile His His Arg Ser Gln Lys Gly Leu Leu His  
20 25 30

<210> 32  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 32

Arg Ser Gln Lys Gly Leu Leu His  
1 5

<210> 33

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Val Leu Cys Ala Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Val Gly Ile Ile Val  
1 5 10 15

Gly Thr Val Leu Ile Ile Lys Ser Leu Arg Ser Gly His Asp Pro Arg  
20 25 30

Ala Gln Gly Thr Leu  
35

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Arg Ser Gly His Asp Pro Arg Ala Gln Gly Thr Leu  
1 5 10

<210> 35

<211> 33

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Thr Leu Thr Gly Ala Gly Gly Phe Val Leu Gly Leu Ile Ile Cys Gly  
1 5 10 15

Val Gly Ile Phe Met His Arg Arg Ser Lys Lys Val Gln Arg Gly Ser  
20 25 30

Ala

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Ser Lys Lys Val Gln Arg Gly Ser Ala

1 5

<210> 37  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 37

Phe Ile Ile Leu Ala Val Ile Val Pro Leu Leu Leu Leu Ile Gly Leu  
1 5 10 15

Ala Leu Trp Phe Arg Lys Arg Cys Phe Cys  
20 25

<210> 38  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 38

Arg Lys Arg Cys Phe Cys  
1 5

<210> 39  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 39

Ile Val Leu Ala Ile Ile Val Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Cys Leu  
1 5 10 15

Ala Leu Trp Tyr Met Arg Arg Arg Ser Tyr Gln Asn Ile Pro  
20 25 30

<210> 40  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 40

Arg Arg Arg Ser Tyr Gln Asn Ile Pro  
1 5

<210> 41  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 41

Trp Ile Ala Leu Val Val Ile Val Pro Leu Val Ile Leu Ile Val Leu



1 5 10 15

Val Leu Trp Phe Lys Lys His Cys Ser Tyr Gln Asp Ile Leu  
20 25 30

<210> 42  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 42

Lys Lys His Cys Ser Tyr Gln Asp Ile Leu  
1 5 10

<210> 43  
<211> 250  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 43

Met Ala Ala Gly Thr Ser Ser Tyr Trp Glu Asp Leu Arg Lys Gln Ala  
1 5 10 15

Arg Gln Leu Glu Asn Glu Leu Asp Leu Lys Leu Val Ser Phe Ser Lys  
20 25 30

Leu Cys Thr Ser Tyr Ser His Ser Ser Thr Arg Asp Gly Arg Arg Asp  
35 40 45

Arg Tyr Ser Ser Asp Thr Thr Pro Leu Leu Asn Gly Ser Ser Gln Asp  
50 55 60

Arg Met Phe Glu Thr Met Ala Ile Glu Ile Glu Gln Leu Leu Ala Arg  
65 70 75 80

Leu Thr Gly Val Asn Asp Lys Met Ala Glu Tyr Thr Asn Ser Ala Gly  
85 90 95

Val Pro Ser Leu Asn Ala Ala Leu Met His Thr Leu Gln Arg His Arg  
100 105 110

Asp Ile Leu Gln Asp Tyr Thr His Glu Phe His Lys Thr Lys Ala Asn  
115 120 125

Phe Met Ala Ile Arg Glu Arg Glu Asn Leu Met Gly Ser Val Arg Lys  
130 135 140

Asp Ile Glu Ser Tyr Lys Ser Gly Ser Gly Val Asn Asn Arg Arg Thr  
145 150 155 160

Glu Leu Phe Leu Lys Glu His Asp His Leu Arg Asn Ser Asp Arg Leu  
165 170 175

Ile Glu Glu Thr Ile Ser Ile Ala Met Ala Thr Lys Glu Asn Met Thr  
180 185 190

Ser Gln Arg Gly Met Leu Lys Ser Ile His Ser Lys Met Asn Thr Leu  
195 200 205

Ala Asn Arg Phe Pro Ala Val Asn Ser Leu Ile Gln Arg Ile Asn Leu  
210 215 220

Arg Lys Arg Arg Asp Ser Leu Ile Leu Gly Gly Val Ile Gly Ile Cys  
225 230 235 240

r Ile Leu Leu Leu Leu Tyr Ala Phe His  
245 250

<210> 44  
<211> 128  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 44

Met Gly Ala Ser Leu Thr Ser Pro Gly Thr Gln Glu Lys Leu Ile Arg  
1 5 10 15

Asp Phe Asp Glu Lys Gln Gln Glu Ala Asn Lys Met Leu Thr Gln Met  
20 25 30

Glu Glu Glu Leu His Tyr Ala Pro Val Ser Phe His Asn Pro Met Met  
35 40 45

Ser Lys Leu Gln Asp Tyr Gln Lys Asp Leu Ala Gln Phe His Leu Glu  
50 55 60

Ala Arg Thr Met Pro Gly Asp Arg Gly Asp Met Lys Tyr Gly Thr Tyr  
65 70 75 80

Ala Val Glu Asn Glu His Met Asn Arg Leu Gln Ser Gln Arg Ala Met  
85 90 95

Leu Leu Gln Gly Thr Lys Ser Leu Gly Arg Ala Thr Gln Glu Thr Asp  
100 105 110

Gln Ile Gly Ser Glu Ile Ser Glu Glu Leu Gly Asn Gln Arg Asp Gln  
115 120 125

<210> 45  
 <211> 212  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 45

Met Asp Pro Leu Phe Gln Gln Thr His Lys Gln Val His Glu Ile Gln  
 1 5 10 15

Ser Cys Met Gly Arg Leu Glu Thr Ala Asp Lys Gln Ser Val His Ile  
 20 25 30

Val Glu Asn Glu Ile Gln Ala Ser Ile Asp Gln Ile Phe Ser Arg Leu  
 35 40 45

Glu Arg Leu Glu Ile Leu Ser Ser Lys Glu Pro Pro Asn Lys Arg Gln  
 50 55 60

Asn Ala Arg Leu Arg Val Asp Gln Leu Lys Tyr Asp Val Gln His Leu  
 65 70 75 80

Gln Thr Ala Leu Arg Asn Phe Gln His Arg Arg His Ala Arg Glu Gln  
 85 90 95

Gln Glu Arg Gln Arg Glu Glu Leu Leu Ser Arg Thr Phe Thr Thr Asn  
 100 105 110

Asp Ser Asp Thr Thr Ile Pro Met Asp Glu Ser Leu Gln Phe Asn Ser  
 115 120 125

Ser Leu Gln Lys Val His Asn Gly Met Asp Asp Leu Ile Leu Asp Gly  
 130 135 140

His Asn Ile Leu Asp Gly Leu Arg Thr Gln Arg Leu Thr Leu Lys Gly  
 145 150 155 160

Thr Gln Lys Lys Ile Leu Asp Ile Ala Asn Met Leu Gly Leu Ser Asn  
 165 170 175

Thr Val Met Arg Leu Ile Glu Lys Arg Ala Phe Gln Asp Lys Tyr Phe  
 180 185 190

Met Ile Gly Gly Met Leu Leu Thr Cys Val Val Met Phe Leu Val Val  
 195 200 205

Gln Tyr Leu Thr  
 210

<210> 46  
<211> 172  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 46

Met Ser Val Pro Gly Pro Ser Ser Pro Asp Gly Ala Leu Thr Arg Pro  
1 5 10 15

Pro Tyr Cys Leu Glu Ala Gly Glu Pro Thr Pro Gly Leu Ser Asp Thr  
20 25 30

Ser Pro Asp Glu Gly Leu Ile Glu Asp Leu Thr Ile Glu Asp Lys Ala  
35 40 45

Val Glu Gln Leu Ala Glu Gly Leu Leu Ser His Tyr Leu Pro Asp Leu  
50 55 60

Gln Arg Ser Lys Gln Ala Leu Gln Glu Leu Thr Gln Asn Gln Val Val  
65 70 75 80

Leu Leu Asp Thr Leu Glu Gln Glu Ile Ser Lys Phe Lys Glu Cys His  
85 90 95

Ser Met Leu Asp Ile Asn Ala Leu Phe Ala Glu Ala Lys His Tyr His  
100 105 110

Ala Lys Leu Val Asn Ile Arg Lys Glu Met Leu Met Leu His Glu Lys  
115 120 125

Thr Ser Lys Leu Lys Lys Arg Ala Leu Lys Leu Gln Gln Lys Arg Gln  
130 135 140

Lys Glu Glu Leu Glu Arg Glu Gln Gln Arg Glu Lys Glu Phe Glu Arg  
145 150 155 160

Glu Lys Gln Leu Thr Ala Arg Pro Ala Lys Arg Met  
165 170

<210> 47  
<211> 301  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 47

Met Ser Cys Arg Asp Arg Thr Gln Glu Phe Leu Ser Ala Cys Lys Ser  
1 5 10 15

Leu Gln Thr Arg Gln Asn Gly Ile Gln Thr Asn Lys Pro Ala Leu Arg  
 20 25 30

Ala Val Arg Gln Arg Ser Glu Phe Thr Leu Met Ala Lys Arg Ile Gly  
 35 40 45

Lys Asp Leu Ser Asn Thr Phe Ala Lys Leu Glu Lys Leu Thr Ile Leu  
 50 55 60

Ala Lys Arg Lys Ser Leu Phe Asp Asp Lys Ala Val Glu Ile Glu Glu  
 65 70 75 80

Leu Thr Tyr Ile Ile Lys Gln Asp Ile Asn Ser Leu Asn Lys Gln Ile  
 85 90 95

Ala Gln Leu Gln Asp Phe Val Arg Ala Lys Gly Ser Gln Ser Gly Arg  
 100 105 110

His Leu Gln Thr His Ser Asn Thr Ile Val Val Ser Leu Gln Ser Lys  
 115 120 125

Leu Ala Ser Met Ser Asn Asp Phe Lys Ser Val Leu Glu Val Arg Thr  
 130 135 140

Glu Asn Leu Lys Gln Gln Arg Ser Arg Arg Glu Gln Phe Ser Arg Ala  
 145 150 155 160

Pro Val Ser Ala Leu Pro Leu Ala Pro Asn His Leu Gly Gly Gly Ala  
 165 170 175

Val Val Leu Gly Ala Glu Ser His Ala Ser Lys Asp Val Ala Ile Asp  
 180 185 190

Met Met Asp Ser Arg Thr Ser Gln Gln Leu Gln Leu Ile Asp Glu Gln  
 195 200 205

Asp Ser Tyr Ile Gln Ser Arg Ala Asp Thr Met Gln Asn Ile Glu Ser  
 210 215 220

Thr Ile Val Glu Leu Gly Ser Ile Phe Gln Gln Leu Ala His Met Val  
 225 230 235 240

Lys Glu Gln Glu Glu Thr Ile Gln Arg Ile Asp Glu Asn Val Leu Gly  
 245 250 255

Ala Gln Leu Asp Val Glu Ala Ala His Ser Glu Ile Leu Lys Tyr Phe  
 260 265 270

Gln Ser Val Thr Ser Asn Arg Trp Leu Met Val Lys Ile Phe Leu Ile  
 275 280 285

Leu Ile Val Phe Phe Ile Ile Phe Val Val Phe Leu Ala  
 290 295 300

<210> 48  
 <211> 255  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 48

Met Ser Met Glu Asp Pro Phe Phe Val Val Lys Gly Glu Val Gln Lys  
 1 5 10 15

Ala Val Asn Thr Ala Gln Gly Leu Phe Gln Arg Trp Thr Glu Leu Leu  
 20 25 30

Gln Asp Pro Ser Thr Ala Thr Arg Glu Glu Ile Asp Trp Thr Thr Asn  
 35 40 45

Glu Leu Arg Asn Asn Leu Arg Ser Ile Glu Trp Asp Leu Glu Asp Leu  
 50 55 60

Asp Glu Thr Ile Ser Ile Val Glu Ala Asn Pro Arg Lys Phe Asn Leu  
 65 70 75 80

Asp Ala Thr Glu Leu Ser Ile Arg Lys Ala Phe Ile Thr Ser Thr Arg  
 85 90 95

Gln Val Val Arg Asp Met Lys Asp Gln Met Ser Thr Ser Ser Val Gln  
 100 105 110

Ala Leu Ala Glu Arg Lys Asn Arg Gln Ala Leu Leu Gly Asp Ser Gly  
 115 120 125

Ser Gln Asn Trp Ser Thr Gly Thr Thr Asp Lys Tyr Gly Arg Leu Asp  
 130 135 140

Arg Glu Leu Gln Arg Ala Asn Ser His Phe Ile Glu Glu Gln Gln Ala  
 145 150 155 160

Gln Gln Gln Leu Ile Val Glu Gln Gln Asp Glu Gln Leu Glu Leu Val  
 165 170 175

Ser Gly Ser Ile Gly Val Leu Lys Asn Met Ser Gln Arg Ile Gly Gly  
 180 185 190

Glu Leu Glu Glu Gln Ala Val Met Leu Glu Asp Phe Ser His Glu Leu  
 195 200 205

Glu Ser Thr Gln Ser Arg Leu Asp Asn Val Met Lys Lys Leu Ala Lys  
 210 215 220

Val Ser His Met Thr Ser Asp Arg Arg Gln Trp Cys Ala Ile Ala Ile  
 225 230 235 240

Leu Phe Ala Val Leu Leu Val Val Leu Ile Leu Phe Leu Val Leu  
 245 250 255

<210> 49  
 <211> 261  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <214> 49

Met Ser Tyr Thr Pro Gly Val Gly Gly Asp Pro Ala Gln Leu Ala Gln  
 1 5 10 15

Arg Ile Ser Ser Asn Ile Gln Lys Ile Thr Gln Cys Ser Val Glu Ile  
 20 25 30

Gln Arg Thr Leu Asn Gln Leu Gly Thr Pro Gln Asp Ser Pro Glu Leu  
 35 40 45

Arg Gln Gln Leu Gln Gln Lys Gln Gln Tyr Thr Asn Gln Leu Ala Lys  
 50 55 60

Glu Thr Asp Lys Tyr Ile Lys Glu Phe Gly Ser Leu Pro Thr Thr Pro  
 65 70 75 80

Ser Glu Gln Arg Gln Arg Lys Ile Gln Lys Asp Arg Leu Val Ala Glu  
 85 90 95

Phe Thr Thr Ser Leu Thr Asn Phe Gln Lys Val Gln Arg Gln Ala Ala  
 100 105 110

Glu Arg Glu Lys Glu Phe Val Ala Arg Val Arg Ala Ser Ser Arg Val  
 115 120 125

Ser Gly Ser Phe Pro Glu Asp Ser Ser Lys Glu Arg Asn Leu Val Ser  
 130 135 140

Trp Glu Ser Gln Thr Gln Pro Gln Val Gln Val Gln Asp Glu Glu Ile  
 145 150 155 160

Thr Glu Asp Asp Leu Arg Leu Ile His Glu Arg Glu Ser Ser Ile Arg  
165 170 175

Gln Leu Glu Ala Asp Ile Met Asp Ile Asn Glu Ile Phe Lys Asp Leu  
180 185 190

Gly Met Met Ile His Glu Gln Gly Asp Val Ile Asp Ser Ile Glu Ala  
195 200 205

Asn Val Glu Asn Ala Glu Val His Val Gln Gln Ala Asn Gln Gln Leu  
210 215 220

Ser Arg Ala Ala Asp Tyr Gln Arg Lys Ser Arg Lys Thr Leu Cys Ile  
225 230 235 240

Ile Leu Ile Leu Val Ile Gly Val Ala Ile Ile Ser Leu Ile Ile  
245 250 255

Trp Gly Leu Asn His  
260

<210> 50  
<211> 236  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 50

Met Ala Pro Asp Pro Trp Phe Ser Thr Tyr Asp Ser Thr Cys Gln Ile  
1 5 10 15

Ala Gln Glu Ile Ala Glu Lys Ile Gln Gln Arg Asn Gln Tyr Glu Arg  
20 25 30

Lys Gly Glu Lys Ala Pro Lys Leu Thr Val Thr Ile Arg Ala Leu Leu  
35 40 45

Gln Asn Leu Lys Glu Lys Ile Ala Leu Leu Lys Asp Leu Leu Leu Arg  
50 55 60

Ala Val Ser Thr His Gln Ile Thr Gln Leu Glu Gly Asp Arg Arg Gln  
65 70 75 80

Asn Leu Leu Asp Asp Leu Val Thr Arg Glu Arg Leu Leu Leu Ala Ser  
85 90 95

Phe Lys Asn Glu Gly Ala Glu Pro Asp Leu Ile Arg Ser Ser Leu Met  
100 105 110



Ser Glu Glu Ala Lys Arg Gly Ala Pro Asn Pro Trp Leu Phe Glu Glu  
115 120 125

Pro Glu Glu Thr Arg Gly Leu Gly Phe Asp Glu Ile Arg Gln Gln Gln  
130 135 140

Gln Lys Ile Ile Gln Glu Gln Asp Ala Gly Leu Asp Ala Leu Ser Ser  
145 150 155 160

Ile Ile Ser Arg Gln Lys Gln Met Gly Gln Glu Ile Gly Asn Glu Leu  
165 170 175

Asp Glu Gln Asn Glu Ile Ile Asp Asp Leu Ala Asn Leu Val Glu Asn  
180 185 190

Asp Glu Lys Leu Arg Asn Glu Thr Arg Arg Val Asn Met Val Asp  
195 200 205

Arg Lys Ser Ala Ser Cys Gly Met Ile Met Val Ile Leu Leu Leu Leu  
210 215 220

Val Ala Ile Val Val Val Ala Val Trp Pro Thr Asn  
225 230 235

<210> 51  
<211> 200  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 51

Met Ser Leu Glu Asp Pro Phe Phe Val Val Arg Gly Glu Val Gln Lys  
5 10 15

Ala Val Asn Thr Ala Arg Gly Leu Tyr Gln Arg Trp Cys Glu Leu Leu  
20 25 30

Gln Glu Ser Ala Ala Val Gly Arg Glu Glu Leu Asp Trp Thr Thr Asn  
35 40 45

Glu Leu Arg Asn Gly Leu Arg Ser Ile Glu Trp Asp Leu Glu Asp Leu  
50 55 60

Glu Glu Thr Ile Gly Ile Val Glu Ala Asn Pro Gly Lys Pro Ala Ala  
65 70 75 80

Gln Lys Ser Pro Ser Asp Leu Leu Asp Ala Ser Ala Val Ser Ala Thr  
85 90 95

Ser Arg Tyr Ile Glu Glu Gln Gln Ala Thr Gln Gln Leu Ile Met Asp  
100 105 110

Glu Gln Asp Gln Gln Leu Glu Met Val Ser Gly Ser Ile Gln Val Leu  
115 120 125

Lys His Met Ser Gly Arg Val Gly Glu Glu Leu Asp Glu Gln Gly Ile  
130 135 140

Met Leu Asp Ala Phe Ala Gln Glu Met Asp His Thr Gln Ser Arg Met  
145 150 155 160

Asp Gly Val Leu Arg Lys Leu Ala Lys Val Ser His Met Thr Ser Asp  
165 170 175

Arg Arg Gln Trp Cys Ala Ile Ala Val Leu Val Gly Val Leu Leu Leu  
180 185 190

Val Leu Ile Leu Leu Phe Ser Leu  
195 200

<210> 52  
<211> 249  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 52

Met Ser Leu Glu Asp Pro Phe Phe Val Val Arg Gly Glu Val Gln Lys  
1 5 10 15

Ala Val Asn Thr Ala Arg Gly Leu Tyr Gln Arg Trp Cys Glu Leu Leu  
20 25 30

Gln Glu Ser Ala Ala Val Gly Arg Glu Glu Leu Asp Trp Thr Thr Asn  
35 40 45

Glu Leu Arg Asn Gly Leu Arg Ser Ile Glu Trp Asp Leu Glu Asp Leu  
50 55 60

Glu Glu Thr Ile Gly Ile Val Glu Ala Asn Pro Gly Lys Phe Lys Leu  
65 70 75 80

Pro Ala Gly Asp Leu Gln Glu Arg Lys Val Phe Val Glu Arg Met Arg  
85 90 95

Glu Ala Val Gln Glu Met Lys Asp His Met Val Ser Pro Thr Ala Val  
100 105 110

Ala Phe Leu Glu Arg Asn Asn Arg Glu Ile Leu Ala Gly Lys Pro Ala  
115 120 125

Ala Gln Lys Ser Pro Ser Asp Leu Leu Asp Ala Ser Ala Val Ser Ala  
130 135 140

Thr Ser Arg Tyr Ile Glu Glu Gln Gln Ala Thr Gln Gln Leu Ile Met  
145 150 155 160

Asp Glu Gln Asp Gln Gln Leu Glu Met Val Ser Gly Ser Ile Gln Val  
165 170 175

Leu Lys His Met Ser Gly Arg Val Gly Glu Glu Leu Asp Glu Gln Gly  
180 185 190

Met Leu Asp Ala Phe Ala Gln Glu Met Asp His Thr Gln Ser Arg  
195 200 205

Met Asp Gly Val Leu Arg Lys Leu Ala Lys Val Ser His Met Thr Ser  
210 215 220

Asp Arg Arg Gln Trp Cys Ala Ile Ala Val Leu Val Gly Val Leu Leu  
225 230 235 240

Leu Val Leu Ile Leu Leu Phe Ser Leu  
245

<210> 53  
<211> 287  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<214> 53

Met Lys Asp Arg Leu Ala Glu Leu Leu Asp Leu Ser Lys Gln Tyr Asp  
1 5 10 15

Gln Gln Phe Pro Asp Gly Asp Asp Glu Phe Asp Ser Pro His Glu Asp  
20 25 30

Ile Val Phe Glu Thr Asp His Ile Leu Glu Ser Leu Tyr Arg Asp Ile  
35 40 45

Arg Asp Ile Gln Asp Glu Asn Gln Leu Leu Val Ala Asp Val Lys Arg  
50 55 60

Leu Gly Lys Gln Asn Ala Arg Phe Leu Thr Ser Met Arg Arg Leu Ser  
65 70 75 80

Ser Ile Lys Arg Asp Thr Asn Ser Ile Ala Lys Ala Phe Arg Ala Arg  
 85 90 95  
 Gly Glu Val Ile His Cys Lys Leu Arg Ala Met Lys Glu Leu Ser Glu  
 100 105 110  
 Ala Ala Glu Ala Gln His Gly Pro His Ser Ala Val Ala Arg Ile Ser  
 115 120 125  
 Arg Ala Gln Tyr Asn Ala Leu Thr Leu Thr Phe Gln Arg Ala Met His  
 130 135 140  
 Asp Tyr Asn Gln Ala Glu Met Lys Gln Arg Asp Asn Cys Lys Ile Arg  
 145 150 155 160  
 Gln Arg Gln Leu Glu Ile Met Gly Lys Glu Val Ser Gly Asp Gln  
 165 170 175  
 Ile Glu Asp Met Phe Glu Gln Gly Lys Trp Asp Val Phe Ser Glu Asn  
 180 185 190  
 Leu Leu Ala Asp Val Lys Gly Arg Gly Pro Pro Thr Thr Arg Ser Arg  
 195 200 205  
 Ala Ala Thr Ala Asn Cys Cys Ala Trp Arg Ala Ala Ile Arg Asp Val  
 210 215 220  
 His Glu Leu Phe Leu Gln Met Ala Val Leu Val Glu Lys Gln Ala Asp  
 225 230 235 240  
 Leu Asn Val Ile Glu Leu Asn Val Gln Lys Thr Val Asp Tyr Thr  
 245 250 255  
 Gly Gln Ala Lys Ala Gln Val Arg Lys Ala Val Gln Tyr Glu Glu Lys  
 260 265 270  
 Asn Pro Cys Arg Thr Leu Cys Cys Phe Cys Cys Pro Cys Leu Lys  
 275 280 285

<210> 54  
 <211> 276  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 54

Met Ser Tyr Gly Pro Leu Asp Met Tyr Arg Asn Pro Gly Pro Ser Gly  
 1 5 10 15

Pro Gln Leu Arg Asp Phe Ser Ser Ile Ile Gln Thr Cys Ser Gly Asn  
20 25 30

Ile Gln Arg Ile Ser Gln Ala Thr Ala Gln Ile Lys Asn Leu Met Ser  
35 40 45

Gln Leu Gly Thr Lys Gln Asp Ser Ser Lys Leu Gln Glu Asn Leu Gln  
50 55 60

Gln Leu Gln His Ser Thr Asn Gln Leu Ala Lys Glu Thr Asn Glu Leu  
65 70 75 80

Leu Lys Glu Leu Gly Ser Leu Pro Leu Pro Leu Ser Thr Ser Glu Gln  
85 90 95

Gln Gln Arg Leu Gln Lys Glu Arg Leu Met Asn Asp Phe Ser Ala  
100 105 110

Ala Leu Asn Asn Phe Gln Ala Val Gln Arg Arg Val Ser Glu Lys Glu  
115 120 125

Lys Glu Ser Ile Ala Arg Ala Arg Ala Gly Ser Arg Leu Ser Ala Glu  
130 135 140

Glu Arg Gln Arg Glu Glu Gln Leu Val Ser Phe Asp Ser His Glu Glu  
145 150 155 160

Trp Asn Gln Met Gln Ser Gln Glu Asp Glu Val Ala Ile Thr Glu Gln  
165 170 175

Leu Glu Leu Ile Lys Glu Arg Glu Thr Ala Ile Arg Gln Leu Glu  
180 185 190

Ala Asp Ile Leu Asp Val Asn Gln Ile Phe Lys Asp Leu Ala Met Met  
195 200 205

Ile His Asp Gln Gly Asp Leu Ile Asp Ser Ile Glu Ala Asn Val Glu  
210 215 220

Ser Ser Glu Val His Val Glu Arg Ala Thr Glu Gln Leu Gln Arg Ala  
225 230 235 240

Ala Tyr Tyr Gln Lys Lys Ser Arg Lys Lys Met Cys Ile Leu Val Leu  
245 250 255

Val Leu Ser Val Ile Ile Leu Ile Leu Gly Leu Ile Ile Trp Leu Val

260

265

270

Tyr Lys Thr Lys  
275

<210> 55  
<211> 302  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 55

Met Ser Glu Asp Glu Glu Lys Val Lys Leu Arg Arg Leu Glu Pro Ala  
1 5 10 15

Ile Gln Lys Phe Ile Lys Ile Val Ile Pro Thr Asn Leu Glu Arg Leu  
20 25 30

G Lys His Gln Ile Asn Ile Glu Lys Tyr Gln Arg Cys Arg Ile Trp  
35 40 45

Asp Lys Leu His Glu Glu His Ile Asn Ala Gly Arg Thr Val Gln Gln  
50 55 60

Leu Arg Ser Asn Ile Arg Glu Ile Glu Lys Leu Cys Leu Lys Val Arg  
65 70 75 80

Lys Asp Asp Leu Val Leu Leu Lys Arg Met Ile Asp Pro Val Lys Glu  
85 90 95

Glu Ala Ser Ala Ala Thr Ala Glu Phe Leu Gln Leu His Leu Glu Ser  
100 105 110

Glu Glu Leu Lys Lys Gln Phe Asn Asp Glu Glu Thr Leu Leu Gln  
115 120 125

Pro Pro Leu Thr Arg Ser Met Thr Val Gly Gly Ala Phe His Thr Thr  
130 135 140

Glu Ala Glu Ala Ser Ser Gln Ser Leu Thr Gln Ile Tyr Ala Leu Pro  
145 150 155 160

Glu Ile Pro Gln Asp Gln Asn Ala Ala Glu Ser Arg Glu Thr Leu Glu  
165 170 175

Ala Asp Leu Ile Glu Leu Ser Gln Leu Val Thr Asp Phe Ser Leu Leu  
180 185 190

Val Asn Ser Gln Gln Glu Lys Ile Asp Ser Ile Ala Asp His Val Asn

195

200

205

Ser Ala Ala Val Asn Val Glu Glu Gly Thr Lys Asn Leu Gly Lys Ala  
 210 215 220

Ala Lys Tyr Lys Leu Ala Ala Leu Pro Val Ala Gly Ala Leu Ile Gly  
 225 230 235 240

Gly Met Val Gly Gly Pro Ile Gly Leu Leu Ala Cys Phe Lys Val Ala  
 245 250 255

Gly Ile Ala Ala Ala Leu Gly Gly Gly Val Leu Gly Phe Thr Gly Gly  
 260 265 270

Lys Leu Ile Gln Arg Lys Lys Gln Lys Met Met Glu Lys Leu Thr Ser  
 275 280 285

Cys Pro Asp Leu Pro Ser Gln Thr Asp Lys Lys Cys Ser  
 290 295 300

<210> 56  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 56

Met Ser Ala Thr Ala Ala Thr Ala Pro Pro Ala Ala Pro Ala Gly Glu  
 1 5 10 15

Gly Gly Pro Pro Ala Pro Pro Pro Asn Leu Thr Ser Asn Arg Arg Leu  
 20 25 30

Gln Thr Gln Ala Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met Arg Val  
 35 40 45

Asn Val Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp  
 50 55 60

Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser  
 65 70 75 80

Ala Ala Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Leu Lys Met Met  
 85 90 95

Ile Ile Leu Gly Val Ile Cys Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile Val  
 100 105 110

Tyr Phe Ser Ser

115

<210> 57  
<211> 100  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 57

Met Ser Thr Gly Pro Thr Ala Ala Thr Gly Ser Asn Arg Arg Leu Gln  
1 5 10 15

Gln Thr Gln Asn Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met Arg Val Asn  
20 25 30

Val Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp Asp  
35 40 45

Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser Ala  
50 55 60

Ala Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Cys Lys Met Trp Ala  
65 70 75 80

Ile Gly Ile Thr Val Leu Val Ile Phe Ile Ile Ile Ile Ile Val Trp  
85 90 95

Val Val Ser Ser  
100

<210> 58  
<211> 141  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 58

Met Pro Pro Lys Phe Lys Arg His Leu Asn Asp Asp Asp Val Thr Gly  
1 5 10 15

Ser Val Lys Ser Glu Arg Arg Asn Leu Leu Glu Asp Asp Ser Asp Glu  
20 25 30

Glu Glu Asp Phe Phe Leu Arg Gly Pro Ser Gly Pro Arg Phe Gly Pro  
35 40 45

Arg Asn Asp Lys Ile Lys His Val Gln Asn Gln Val Asp Glu Val Ile  
50 55 60

Asp Val Met Pro Glu Asn Ile Thr Lys Val Ile Glu Arg Gly Glu Arg  
65 70 75 80



Leu Asp Glu Leu Gln Asp Lys Ser Glu Ser Leu Ser Asp Asn Ala Thr  
85 90 95

Ala Phe Ser Asn Arg Ser Lys Gln Leu Arg Arg Gln Met Trp Trp Arg  
100 105 110

Gly Cys Lys Ile Lys Ala Ile Met Ala Leu Val Ala Ala Ile Leu Leu  
115 120 125

Leu Val Ile Ile Ile Leu Ile Val Met Lys Tyr Arg Thr  
130 135 140

<210> 59  
<211> 220  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<214> 59

Met Ala Ile Leu Phe Ala Val Val Ala Arg Gly Thr Thr Ile Leu Ala  
1 5 10 15

Lys His Ala Trp Cys Gly Gly Asn Phe Leu Glu Val Thr Glu Gln Ile  
20 25 30

Leu Ala Lys Ile Pro Ser Glu Asn Asn Lys Leu Thr Tyr Ser His Gly  
35 40 45

Asn Tyr Leu Phe His Tyr Ile Cys Gln Asp Arg Ile Val Tyr Leu Cys  
50 55 60

Ile Thr Asp Asp Asp Phe Glu Arg Ser Arg Ala Phe Asn Phe Leu Asn  
70 75 80

Glu Ile Lys Lys Arg Phe Gln Thr Thr Tyr Gly Ser Arg Ala Gln Thr  
85 90 95

Ala Leu Pro Tyr Ala Met Asn Ser Glu Phe Ser Ser Val Leu Ala Ala  
100 105 110

Gln Leu Lys His His Ser Glu Asn Lys Gly Leu Asp Lys Val Met Glu  
115 120 125

Thr Gln Ala Gln Val Asp Glu Leu Lys Gly Ile Met Val Arg Asn Ile  
130 135 140

Asp Leu Val Ala Gln Arg Gly Glu Arg Leu Glu Leu Leu Ile Asp Lys  
145 150 155 160

Thr Glu Asn Leu Val Asp Ser Ser Val Thr Phe Lys Thr Thr Ser Arg  
165 170 175

Asn Leu Ala Arg Ala Met Cys Met Lys Asn Leu Lys Leu Thr Ile Ile  
180 185 190

Ile Ile Ile Val Ser Ile Val Phe Ile Tyr Ile Ile Val Ser Pro Leu  
195 200 205

Cys Gly Gly Phe Thr Trp Pro Ser Cys Val Lys Lys  
210 215 220

<210> 60  
<211> 100  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

Met Glu Glu Ala Ser Glu Gly Gly Gly Asn Asp Arg Val Arg Asn Leu  
1 5 10 15

Gln Ser Glu Val Glu Gly Val Lys Asn Ile Met Thr Gln Asn Val Glu  
20 25 30

Arg Ile Leu Ala Arg Gly Glu Asn Leu Glu His Leu Arg Asn Lys Thr  
35 40 45

Glu Asp Leu Glu Ala Thr Ser Glu His Phe Lys Thr Thr Ser Gln Lys  
50 55 60

Val Ala Arg Lys Phe Trp Trp Lys Asn Val Lys Met Ile Val Leu Ile  
70 75 80

Cys Val Ile Val Phe Ile Ile Ile Leu Phe Ile Val Leu Phe Ala Thr  
85 90 95

Gly Ala Phe Ser  
100

<210> 61  
<211> 203  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 61

Met Ser Ser Asp Phe Glu Gly Tyr Glu Gln Asp Phe Ala Val Leu Thr  
1 5 10 15

Ala Glu Ile Thr Ser Lys Ile Ala Arg Val Pro Arg Leu Pro Pro Asp  
20 25 30

Glu Lys Lys Gln Met Val Ala Asn Val Glu Lys Gln Leu Glu Glu Ala  
35 40 45

Lys Glu Leu Leu Glu Gln Met Asp Leu Glu Val Arg Glu Ile Pro Pro  
50 55 60

Gln Ser Arg Gly Met Tyr Ser Asn Arg Met Arg Ser Tyr Lys Gln Glu  
65 70 75 80

Met Gly Lys Leu Glu Thr Asp Phe Lys Arg Ser Arg Ile Ala Tyr Ser  
85 90 95

Asp Glu Val Arg Asn Glu Leu Leu Gly Asp Asp Gly Asn Ser Ser Glu  
100 105 110

Asn Gln Arg Ala His Leu Leu Asp Asn Thr Glu Arg Leu Glu Arg Ser  
115 120 125

Ser Arg Arg Leu Glu Ala Gly Tyr Gln Ile Ala Val Glu Thr Glu Gln  
130 135 140

Ile Gly Gln Glu Met Leu Glu Asn Leu Ser His Asp Arg Glu Lys Ile  
145 150 155 160

Gln Arg Ala Arg Glu Arg Leu Arg Glu Thr Asp Ala Asn Leu Gly Lys  
165 170 175

Ser Ser Arg Ile Leu Thr Gly Met Leu Arg Arg Gly Cys Ser Val Lys  
180 185 190

Lys Gln Cys Asn Leu Ser Leu Ala Pro Lys Ala  
195 200

<210> 62  
<211> 269  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 62

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp  
1 5 10 15

Gly Asp Thr Val Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe  
20 25 30

Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp Lys Ile Thr Gln  
35 40 45

Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro  
50 55 60

Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu  
65 70 75 80

Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu Lys Ala Ile Glu  
85 90 95

Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp Leu  
100 105 110

Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu  
115 120 125

Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser  
130 135 140

Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr  
145 150 155 160

Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe  
165 170 175

Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn  
180 185 190

Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile  
195 200 205

Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr  
210 215 220

Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Met Asn Ala Thr  
225 230 235 240

Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr  
245 250 255

Gln Ser Lys Ala Arg Arg Val Ser Leu Ala Ser Lys Asn  
260 265

<210> 63  
<211> 222

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 63

Gln Met Ala Ala Leu Ala Pro Leu Pro Pro Leu Pro Ala Gln Phe Lys  
1 5 10 15

Ser Ile Gln His His Leu Arg Thr Ala Gln Glu His Asp Lys Arg Asp  
20 25 30

Pro Val Val Ala Tyr Tyr Cys Arg Leu Tyr Ala Met Gln Thr Gly Met  
35 40 45

Lys Ile Asp Ser Lys Thr Pro Glu Cys Arg Lys Phe Leu Ser Lys Leu  
50 55 60

Met Asp Gln Leu Glu Ala Leu Lys Lys Gln Leu Gly Asp Asn Glu Ala  
70 75 80

Ile Thr Gln Glu Ile Val Gly Cys Ala Leu Glu Asn Tyr Ala Leu Lys  
85 90 95

Met Phe Leu Tyr Ala Asp Asn Glu Asp Arg Ala Gly Arg Phe His Lys  
100 105 110

Asn Met Ile Lys Ser Phe Tyr Thr Ala Ser Leu Leu Ile Asp Val Ile  
115 120 125

Thr Val Phe Gly Glu Leu Thr Asp Glu Asn Val Lys His Arg Lys Tyr  
130 135 140

Ala Arg Trp Lys Ala Thr Tyr Ile His Asn Cys Leu Lys Glu Trp Gly  
145 150 155 160

Asp Ser Ser Ser Arg Pro Cys Trp Glu Leu Lys Lys Ile Met Ile Leu  
165 170 175

Lys Lys Met Lys Met Leu Glu Gln Pro Leu Cys Pro Leu Ser Gln Leu  
180 185 190

Ser His His His Leu Gln Leu Met Thr Gln Gln His Ala Ile Arg Gln  
195 200 205

Leu Tyr Trp Asn Thr Asp Ser Ser Gly Cys Thr Arg Ser Ser  
210 215 220